



**Universidade Nova de Lisboa
Instituto de Higiene e Medicina Tropical**

**Avaliação de Piriproxifeno como ferramenta para estratégias de
controlo vetorial de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) na Ilha da
Madeira: estudo piloto na região do Paúl do Mar**

Bianca Maria Parreira Pires

**DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE
EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS – ESPECIALIDADE DE
PARASITOLOGIA MÉDICA**

Julho 2015



Universidade Nova de Lisboa
Instituto de Higiene e Medicina Tropical

**Avaliação de Piriproxifeno como ferramenta para estratégias de
controlo vetorial de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) na Ilha da
Madeira: estudo piloto na região do Paúl do Mar**

Autora: Bianca Maria Parreira Pires

Orientadora: Professora Doutora Carla A. Sousa (UEIPM/IHMT/UNL)

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de
Mestre em Ciências Biomédicas – Especialidade de Parasitologia Médica

Apoio financeiro de

Fundação para Ciência e Tecnologia, Projeto PTDC/SAU-EPI/115853/2009

DENFREE, Projecto do programa FP7-HEALTH (ref. 282378)

*“Either write something worth reading
or do something worth writing”*

Benjamin Franklin

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, por todo o carinho e apoio incondicional desde sempre, que me ajudaram a atingir mais uma etapa importante. Agradeço todos os dias por estarem presentes na minha vida.

À minha orientadora Carla Sousa, pela confiança em mim depositada para o desenvolvimento deste projeto e pela disponibilidade e paciência perante todas as minhas dúvidas. Agradeço por todos os conhecimentos que me transmitiu e me ter “apresentado” e suscitado o interesse pela área da Entomologia Médica e Controlo Vetorial.

Ao Gonçalo Seixas e Gonçalo Alves, companheiros de estadia na cidade do Funchal, pela ajuda, disponibilidade e aprendizagem, desde o início deste projeto, que me permitiu entrar no “mundo” do Controlo Vetorial. Obrigado por tudo.

Ao Greg Devine e Richard Paul, pela disponibilização do desenho experimental deste projeto, pelo acompanhamento e recomendações que foram o “fio condutor” para a elaboração deste trabalho.

Aos colaboradores do IASAUDE, nomeadamente à enfermeira Ana Clara Silva, à Margarida Clairouin, à Bela, à Fátima, e à Eng^a Dores Vacas, por toda a disponibilidade e ajuda que tornaram possível o desenvolvimento de todo o trabalho na freguesia do Paúl do Mar e na cidade do Funchal.

Ao Museu por ter disponibilizado os dados das densidades de mosquito na cidade do Funchal.

Ao Luís Antunes, por toda a disponibilidade, dedicação e paciência para a elaboração dos mapas, que são imprescindíveis para este trabalho. Obrigado.

À população da freguesia do Paúl do Mar e da freguesia de Santa Luzia, pela hospitalidade, simpática, disponibilidade e colaboração que permitiram a elaboração deste projeto. Muito obrigado.

À Flávia Ribeiro, não só pelos momentos de descontração e companhia, como também pela ajuda e disponibilidade na reta final deste trabalho. Muito obrigado!

Ao Tiago, que sempre acreditou em mim e apoiou incondicionalmente. Obrigado pela força e confiança, que despertam em mim a vontade de “alargar horizontes” e querer procurar e alcançar mais.

Às minhas colegas de Mestrado em Ciências Biomédicas, Marta Ribeiro e Marta Palmeirim, pela amizade, momentos de descontração e apoio. Obrigado.

RESUMO

O piriproxifeno (PPF), químico que mimetiza a hormona juvenil dos insetos, é um composto promissor para o controlo de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762). Este larvicida interfere no desenvolvimento dos mosquitos, inibindo a emergência dos adultos e causando a esterilização das fêmeas após contato. Este químico tem também a particularidade de atuar em doses muito reduzidas, o que permite a sua dispersão entre criadouros tratados e não tratados através dos próprios mosquitos, no ato de oviposição e repouso. Assim, o objetivo deste trabalho foi o de avaliar a eficácia da auto-disseminação de piriproxifeno pela população de *Ae. aegypti* na freguesia do Paúl do Mar, concelho da Calheta, na Ilha da Madeira, como metodologia de controlo vetorial.

Primeiramente, foi realizada a otimização da metodologia a aplicar. Comparou-se a eficácia de armadilhas BG-sentinel® com as armadilhas GAT® por forma a decidir qual seria o modo mais eficaz de disseminação de PPF a utilizar. Face à estrutura das armadilhas GAT, que inclui uma rede impregnada com inseticida, foram realizados testes de suscetibilidade a inseticidas da OMS às populações de *Ae. aegypti* do Paúl do Mar e Funchal, e testes de cone OMS para testar a eficácia das redes impregnadas das armadilhas GAT.

O estudo de auto-disseminação foi dividido em pré-tratamento, tratamento e pós-tratamento. Na primeira fase foram avaliadas as densidades da população adulta e determinado o tempo de desenvolvimento e a taxa de emergência de adultos provenientes de larvas de 3º instar *Ae. aegypti* de 37 criadouros sentinela, na ausência de PPF. Na segunda, foi realizada a auto-disseminação de PPF recorrendo armadilhas BG-sentinel® como estações de disseminação. Para avaliar o efeito da disseminação, no pós-tratamento, as densidades de *Ae. aegypti* foram avaliadas.

Por último, foi realizado um bioensaio de transferência de PPF entre machos expostos e fêmeas não expostas, por forma a analisar os efeitos esterilizantes deste químico utilizando os machos como veículo de disseminação.

Os resultados revelaram que as armadilhas BG-sentinel® são mais eficazes na captura de *Ae. aegypti*, e, como tal, foram utilizadas como estações de disseminação. Além disso, verificou-se que a população de *Ae. aegypti* é resistente a vários inseticidas e que as redes impregnadas das armadilhas GAT® não são eficazes para captura de exemplares desta espécie. Quanto ao estudo de auto-disseminação, houve diferenças estatisticamente significativas na emergência de adultos nos criadouros sentinela entre o pré e o pós-tratamento ($P < 0.0001$). A avaliação da abundância de *Ae. aegypti* após a auto-disseminação de PPF revelou que não houve diferenças no total de fêmeas colhidas ($P > 0.05$) antes e após a disseminação de PPF no Paúl do Mar. No entanto, o número de ovos depositados nas *ovitrap*s no Paúl do Mar decresceu abruptamente após o período de disseminação de PPF. O bioensaio de transferência de PPF, embora preliminar, sugere que a ação de PPF pode afetar a prógene que advém da exposição dos seus progenitores machos ao PPF.

Concluindo, os resultados obtidos demonstram que a auto-disseminação de PPF pode ser uma estratégia de controlo de *Ae. aegypti* eficaz na Madeira.

Palavras-chave: *Aedes aegypti*, piriproxifeno, auto-disseminação

ABSTRACT

The pyriproxyfen (PPF), a chemical that mimics juvenile hormone of insects, is a promising compound for the control of *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762). This larvicide interferes with the development of mosquitoes by inhibiting the emergence of adults, and may cause sterilization of female mosquitoes. This chemical acts in very low doses, which allows the mosquitoes to carry this chemical from treated breeding sites to untreated water collections during the act of oviposition and/or resting. Thus, the aim of this study was to evaluate the effectiveness of pyriproxyfen auto-dissemination by *Ae. aegypti* in the village of Paul do Mar, Calheta, Madeira Island, as vector control strategy.

First, we optimized the methodology to be applied. The effectiveness of BG-Sentinel® traps and GAT trap®s were compared in order to decide which trap would act as PPF dissemination stations. Since GAT traps have an insecticide impregnated net WHO insecticide susceptibility tests were carried-out with *Ae. aegypti* populations of Paul do Mar and Funchal. Cone tests were also used according WHO protocols to access the effectiveness of the GAT's insecticide impregnated net.

The auto-dissemination study was divided into pre-treatment, treatment and post-treatment. During the first phase *Ae. aegypti* adult's density was evaluated and the development time and adult emergence rate of 3th instar larvae were determined in 37 sentinel breeding sites, in the absence of PPF. In the second phase, PPF dissemination was carried-out using BG-sentinel® traps as dissemination stations. To evaluate the effect of PPF dissemination, in the third phase *Ae. aegypti* densities were determined.

Finally, a PPF transfer bioassay between exposed males and non-exposed females was performed to evaluate the sterilizing effects of this mode of dissemination.

The results showed that BG-Sentinel® traps are more effective to capture *Ae. aegypti*, and thus, were used as dissemination stations. Furthermore, it was found that *Ae. aegypti* is resistant to various insecticides, and the GAT impregnated nets are not effective to capture specimens of this species. As for the auto-dissemination study, there were statistically significant differences in adult emergence of larvae of sentinel breeding sites between the pre- and post-treatment ($P < 0.0001$). The assessment of *Ae. aegypti* densities after PPF dissemination revealed no differences in the total number of collected females ($p > 0.05$), before and after the dissemination of PPF in Paul do Mar. However, the number of eggs laid in the ovitraps of Paul do Mar decreased abruptly after the PPF dissemination period. Regarding PPF transference bioassay, although preliminary, results suggested that PPF may affect the progeny of males exposed to PPF.

In conclusion, results have shown that PPF auto-dissemination is a promising control strategy for *Ae. aegypti* in Madeira Island.

Keywords: *Aedes aegypti*, pyriproxyfen, auto-dissemination

ÍNDICE GERAL

<i>AGRADECIMENTOS</i>	<i>II</i>
<i>RESUMO</i>	<i>IV</i>
<i>ABSTRACT</i>	<i>V</i>
<i>ÍNDICE GERAL</i>	<i>VI</i>
<i>ÍNDICE DE FIGURAS</i>	<i>X</i>
<i>ÍNDICE DE TABELAS</i>	<i>XII</i>
<i>SIGLAS E ABREVIATURAS</i>	<i>XIV</i>
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. O mosquito <i>Aedes aegypti</i> (Linnaeus, 1762)	1
1.1.1. Ciclo de vida de <i>Aedes aegypti</i>	3
1.1.2. Origem e distribuição mundial.....	4
1.1.2.1. <i>Aedes aegypti</i> em Portugal – Ilha da Madeira.....	5
1.2. Importância médica de <i>Ae. aegypti</i>	7
1.2.1. Febre-amarela.....	7
1.2.2. Dengue	8
1.2.2.1. Dengue da Ilha da Madeira	9
1.2.3. Chikungunya	9
1.3. Controlo vetorial	10
1.3.1. Controlo vetorial de <i>Aedes aegypti</i>	11

1.3.2.	Controlo químico	12
1.3.2.1.	Organoclorados	13
1.3.2.2.	Organofosforados	13
1.3.2.3.	Carbamatos.....	14
1.3.2.4.	Piretróides	14
1.3.2.5.	Reguladores de crescimento de insetos.....	15
1.3.2.5.1.	Piriproxifeno.....	16
1.3.2.5.1.1.	Piriproxifeno para o controlo de <i>Aedes aegypti</i>	16
1.3.3.	Controlo vetorial de <i>Aedes aegypti</i> na Ilha da Madeira	18
1.4.	Vigilância entomológica de <i>Aedes aegypti</i> na Ilha da Madeira.....	19
1.5.	Resistência a inseticidas.....	20
1.5.1.	Resistência a inseticidas na população de <i>Aedes aegypti</i> na Ilha da Madeira .	22
2.	OBJETIVOS	24
2.1.	Objetivo geral	24
2.2.	Objetivos específicos	24
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1.	Ilha da Madeira	26
3.1.1.	Concelho da Calheta - Freguesia do Paúl do Mar	27
3.2.	Colónia de mosquitos.....	28
3.3.	Otimização da metodologia a aplicar no Paúl do Mar.....	29

3.3.1. Avaliação da eficácia das armadilhas GAT e BGs na área em estudo no Paúl do Mar e em Santa Luzia	29
3.3.2. Testes diagnóstico da OMS de suscetibilidade a aduicidas	33
3.3.3. Testes de cone da OMS para avaliação da eficácia das redes impregnadas com alfa-cipermetrina das armadilhas GAT	35
3.3.4. Avaliação das armadilhas BGs como meio de disseminação de piriproxifeno	36
3.4. Estudo piloto de auto-disseminação de piriproxifeno no Paúl do Mar	37
3.5. Bioensaio de transferência de piriproxifeno de machos adultos para fêmeas	39
3.6. Análise estatística	41
4. RESULTADOS	42
4.1. Otimização da metodologia a aplicar no Paúl do Mar	42
4.1.1. Avaliação da eficácia das armadilhas GAT e BGs na área em estudo no Paúl do Mar e em Santa Luzia	42
4.1.2. Testes de suscetibilidade a aduicidas	44
4.1.3. Testes de Cone para avaliar a eficácia das redes impregnadas com alfa cipermetrina das armadilhas GAT	46
4.1.4. Avaliação das armadilhas BGs como meio de disseminação de piriproxifeno	49
4.2. Estudo piloto de auto-disseminação de piriproxifeno no Paúl do Mar	49
4.3. Bioensaio de transferência de piriproxifeno de machos adultos para fêmeas	57
5. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES	60
5.1. Otimização da metodologia a aplicar no Paúl do Mar	60

5.1.1.	Avaliação da eficácia das armadilhas GAT e BGs na área em estudo no Paúl do Mar e em Santa Luzia	60
5.1.2.	Testes de suscetibilidade a adulticidas	62
5.1.3.	Testes de cone para avaliar a eficácia das redes impregnadas com alfa-cipermetrina das armadilhas GAT	63
5.1.4.	Avaliação das armadilhas BGs como meio de disseminação de piriproxifeno	64
5.2.	Estudo piloto de auto-disseminação de piriproxifeno no Paúl do Mar.....	65
5.3.	Bioensaio de transferência de piriproxifeno de machos adultos para fêmeas	73
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	77
7.	BIBLIOGRAFIA	79

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: <i>Ae. aegypti</i> adulto. (a) Vista geral de um macho; (b) pormenor do tórax com o desenho da lira e as duas linhas médias. (fotografias da autora).....	2
Figura 2: Expansão de <i>Ae. aegypti</i> na Ilha da Madeira desde a primeira notificação no Funchal em 2005 até 2012. (Adaptado de ECDC 2014)	6
Figura 3: Mapa da distribuição mundial dos surtos de dengue (fonte: http://www.healthmap.org/dengue/en/ , acedido em 11/02/2015)	9
Figura 4: Localização geográfica do arquipélago da Madeira	26
Figura 5: Concelho da Calheta e as respetivas freguesias. (Imagem adaptada do Roteiro Turístico do Concelho da Calheta: http://www.cmcalheta.pt/wordpress/?p=518 , acedido a 16/03/2015)	27
Figura 6: Freguesia do Paúl do Mar (fonte: Google Maps, imagem de satélite).....	28
Figura 7: Armadilha BGs no pátio de uma casa no Paúl do Mar (fotografia da autora).....	30
Figura 8: Armadilhas GAT colocadas em pátios de casas no Paúl do Mar (fotografias da autora).....	31
Figura 9: Distribuição das armadilhas BGs e GAT na área em estudo no Paúl do Mar (mapa elaborado em colaboração com o IASAÚDE)	32
Figura 10: Distribuição das armadilhas GAT em Santa Luzia, Funchal, conjuntamente com armadilhas BGs e <i>ovitrap</i> s distribuídas pelas equipas da Unidade de Saúde Ambiental do IASAÚDE (mapa elaborado em colaboração com o IASAÚDE)....	32
Figura 11: Testes de Cone realizados para as redes impregnadas com inseticida das armadilhas GAT	35
Figura 12: Exposição dos machos <i>Ae. aegypti</i> à formulação de piriproxifeno	40
Figura 13: Capturas de <i>Ae. aegypti</i> (fêmeas+machos)(figura 13.a) e capturas de <i>Ae. aegypti</i> fêmeas (figura 13.b) por armadilha, por dia, no Paúl do Mar e em Santa Luzia	43
Figura 14: Mosquitos recapturados (macho à esquerda e fêmea à direita) marcados com o pó-fluorescente. (fotografias da autora)	49
Figura 15: Taxas de mortalidade obtidas nos criadouros artificiais na fase de pré-tratamento. Nota: as linhas representam uma interpolação entre as taxas de	

mortalidade registadas nos criadouros artificiais (mapa elaborado em colaboração com o IASAUDE).	50
Figura 16: Taxas de mortalidade obtidas nos criadouros artificiais no 1º tratamento. Nota: as linhas representam uma interpolação entre as taxas de mortalidade registadas nos criadouros artificiais (mapa elaborado em colaboração com o IASAUDE)	51
Figura 17: Taxas de mortalidade obtidas nos criadouros artificiais no 2º tratamento. Nota: as linhas representam uma interpolação entre as taxas de mortalidade registadas nos criadouros artificiais (mapa elaborado em colaboração com o IASAUDE).	52
Figura 18: Número de ovos recolhidos por <i>ovitrap</i> por semana no Paúl do Mar e em Santa. Luzia em 2014	62
Figura 19: Número de ovos recolhidos por <i>ovitrap</i> por semana no Paúl do Mar em 2014.....	70
Figura 20: Número de ovos recolhidos por <i>ovitrap</i> por semana no Paúl do Mar nos em 2013 e 2014	70
Figura 21: Número de ovos recolhidos por <i>ovitrap</i> por semana no Funchal em 2012, 2013 e 2014	71
Figura 22: Número de ovos recolhidos por <i>ovitrap</i> no Paúl do Mar e no Funchal em 2014.....	71

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Número médio de exemplares <i>Ae. aegypti</i> (fêmeas+machos) capturados por armadilha, por dia, no Paúl do Mar e em Santa Luzia.	42
Tabela 2: Número médio de fêmeas <i>Ae. aegypti</i> capturadas por armadilha, por dia, no Paúl do Mar e em Santa Luzia.....	42
Tabela 3: Comparação das capturas de <i>Ae. aegypti</i> pelas GAT entre o Paúl do Mar e Santa Luzia	43
Tabela 4: Resultados dos testes diagnóstico OMS de suscetibilidade das populações Paúl do Mar (PdM) e Funchal (Fx) à permetrina	44
Tabela 5: Resultados dos testes de diagnóstico OMS de suscetibilidade das populações Paúl do Mar (PdM) e Funchal (Fx) à ciflutrina.....	45
Tabela 6: Resultados dos testes diagnóstico OMS de suscetibilidade das populações Paúl do Mar (PdM) e Funchal (Fx) ao <i>bendiocarb</i>	45
Tabela 7: Resultados dos testes diagnóstico OMS de suscetibilidade das populações Paúl do Mar (PdM) e Funchal (Fx) à fenitrothion.....	46
Tabela 8: Resultados obtidos pelos Testes de Cone para a população Rockefeller (Rock).....	47
Tabela 9: Resultados obtidos pelos Testes de Cone para a população Funchal (Fx)	47
Tabela 10: Resultados obtidos pelos Testes de Cone para a população Paúl do Mar (PdM).....	47
Tabela 11: Comparação das taxas de mortalidade entre as três populações testadas: Rockefeller (Rock), Funchal (Fx) e Paúl do Mar (PdM).....	48
Tabela 12: Comparação das taxas de mortalidade entre as 5 redes impregnadas das GAT testadas	48
Tabela 13: Resultados obtidos nas fases de pré-tratamento e tratamento	49
Tabela 14: Teste estatístico do Qui-quadrado para comparar os resultados referentes à taxa de mortalidade obtida nas fases de pré-tratamento e tratamento.	53
Tabela 15: Resultados das capturas de <i>Ae. aegypti</i> pelas armadilhas BGs antes e após a disseminação de PPF	54

Tabela 16: Teste de Mann-Whitney para comparação das capturas de <i>Ae. aegypti</i> antes e após a disseminação de PPF	54
Tabela 17: Teste <i>t</i> para comparar as capturas de <i>Ae. aegypti</i> pelas armadilhas BGs no Funchal, antes e após a disseminação de PPF no Paúl do Mar	55
Tabela 18: Teste <i>t</i> para comparar as capturas de fêmeas <i>Ae. aegypti</i> pelas armadilhas BGs no Funchal, antes e após a disseminação de PPF no Paúl do Mar	55
Tabela 19: Teste <i>t</i> para comparar as capturas de <i>Ae. aegypti</i> entre o Paúl do Mar e o Funchal antes da disseminação de PPF	55
Tabela 20: Teste <i>t</i> para comparar as capturas de fêmeas <i>Ae. aegypti</i> entre o Paúl do Mar e o Funchal antes da disseminação de PPF	56
Tabela 21: Teste <i>t</i> para comparar as capturas de <i>Ae. aegypti</i> entre o Paúl do Mar e o Funchal após a disseminação de PPF	56
Tabela 22: Teste de Mann Whitney para comparar as capturas de fêmeas <i>Ae. aegypti</i> entre o Paúl do Mar e o Funchal após a disseminação de PPF.....	56
Tabela 23: Número de ovos postos e retidos pelas fêmeas que copularam com os machos expostos e não expostos (grupo controlo) ao PPF.....	57
Tabela 24: Comparação do número médio de ovos postos/fêmea entre as fêmeas dos grupos teste e as fêmeas do grupo controlo	58
Tabela 25: Comparação entre o número de ovos retidos pelas fêmeas dos grupos teste e pelas fêmeas do grupo controlo	58
Tabela 26: Número de eclosões após 9 dias de emergência dos papéis de filtro contendo ovos.....	59
Tabela 27: Comparação entre o número de larvas eclodidas do grupo controlo e dos grupos teste.	59

SIGLAS E ABREVIATURAS

AChe	Enzima acetilcolinesterase
BGs	Biogents-sentinel trap
Bti	<i>Bacillus thuringiensis</i> subespécie <i>israelensis</i> , serotipo H14
C°	Grau Celsius
CDC	Center for Disease Prevention and Control
CHIK	Vírus chikungunya
DDT	Dicloro-difenil-tricloroetano
DENV	Vírus da dengue
DRADR-	Direção Regional de Agricultura e Desenvolvimento Rural da Região
RAM	Autónoma da Madeira
FA	Febre-amarela
Fx	Funchal
GAT	Gravid Aedes trap
HJ	Hormona juvenil
HR	Humidade relativa
IASAUDE	Instituto da Administração da Saúde e Assuntos Sociais
INSA	Instituto Nacional de Saúde de Lisboa
<i>kdr</i>	Resistência knockdown
L.	Linnaeus
CL50	Concentração letal 50%
MAC	Madeira-Açores-Canárias
mtADN	ADN mitocondrial
OP	Organofosforados
OC	Organoclorados
OMS	Organização Mundial da Saúde
PPF	Piriproxifeno
PdM	Paul do Mar
PY	Piretróides
RAM	Região Autónoma da Madeira
RCI	Reguladores do crescimento de insetos
REVIVE	Rede de Vigilância de Vetores
Rock	Rockefeller
ULV	Ultra low volume
US\$	Dólar americano
VFA	Vírus da febre-amarela
V	Volts

1. INTRODUÇÃO

1.1. O mosquito *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762)

Os mosquitos pertencem ao Filo Artrópoda, Classe Insecta, Ordem Diptera, Subordem Nematocera e Família Culicidae. A família Culicidae subdivide-se em três subfamílias, Culicinae e Anophelinae, estas com importância médica dado que as fêmeas são hematófagas, e a subfamília Toxorhynchitinae. Os mosquitos estão distribuídos por todos os continentes, com exceção da Antártida, estando descritas cerca de 3500 espécies e subespécies de mosquitos, habitando abaixo do nível do mar até 3000 metros de altitude (Almeida, 2011; Marquardt et al., 2005).

A família Culicidae, tal como todos os dípteros, são insetos holometabólicos com metamorfoses completas, em que as formas imaturas diferem do estado adulto. A fase de desenvolvimento larvar passa por quatro estados. Nas larvas, a cabeça é mais quitinizada e contém sedas várias que auxiliam na identificação específica. O tórax é globoso contendo sedas de dimensão variável, seguindo-se o abdómen, mais estreito, dividido por 8 segmentos. No final do abdómen, nas subfamílias Culicinae e Toxorhynchitinae, é possível observar uma estrutura saliente e alongada, o sifão destinado à respiração. Na subfamília Anophelinae esta estrutura está ausente e os espiráculos respiratórios abrem diretamente na superfície tergal do final do abdómen (Almeida, 2011; Marquardt et al., 2005).

A morfologia geral de um culicídeo adulto é caracterizada por um tamanho médio entre 3-6 mm, corpo coberto de escamas com diferentes cores e padrões que ajudam na identificação das espécies, patas longas e finas e um par de asas membranosas compridas e estreitas. A cabeça é pequena e esférica com olhos dicóticos, possui palpos e antenas que permitem a diferenciação sexual, que são pilosas nas fêmeas e plumosas nos machos (Almeida, 2011; Marquardt et al., 2005). A alimentação do adulto é efetuada através do probóscis. Nas fêmeas é uma estrutura alongada, picadora-sugadora adaptada à hematofagia por solenofagia, ou seja, à perfuração da pele do hospedeiro e sucção do sangue diretamente dos vasos sanguíneos, além da ingestão de néctares e sucos de plantas. Os machos também possuem probóscis que está

destinado exclusivamente à sucção de néctares e sucos das plantas (Araújo et al 2012; Marquardt et al., 2005).

O mosquito *Ae. aegypti* é facilmente identificável (Figura 1). A coloração escura, preta ou castanha, e o tórax com um desenho em escamas brancas que se assemelha a uma lira, com duas linhas médias transversais, são características desta espécie (Andrew & Bar, 2013).

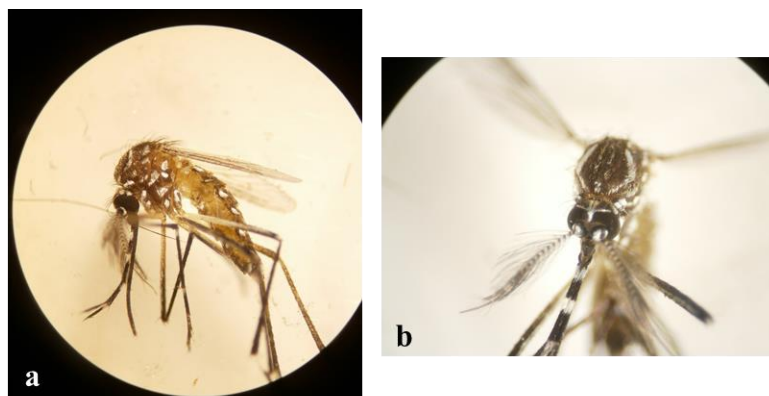


Figura 1: *Ae. aegypti* adulto. (a) Vista geral de um macho; (b) pormenor do tórax com o desenho da lira e as duas linhas médias. (fotografias da autora)

A refeição sanguínea é necessária para que ocorra a maturação ovárica e subsequente produção de ovos, embora algumas espécies sejam capazes de efetuar o primeiro ciclo gonotrófico na ausência de uma refeição de sangue, denominadas por autogénicas (Attardo et al., 2005). A biologia de reprodução dos mosquitos está diretamente relacionada com a transmissão de doenças vectoriais, visto que é no decorrer da refeição sanguínea que os agentes patogénicos são inoculados conjuntamente com a saliva que contém vasodilatadores e anticoagulantes que facilitam a refeição sanguínea (Almeida, 2011; Attardo et al., 2005).

O mosquito *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) é uma das espécies com maior importância médica dado que é o vetor primário de febre-amarela urbana, dengue e chikungunya (Marquardt et al., 2005; Staples et al., 2009). É uma espécie associada a ambientes urbanos, e muito antropofílica, sendo que as fêmeas têm preferência hemática de sangue humano. Além disso, tende a realizar as refeições por sangue e repousar no interior das habitações, sendo, por isso, um mosquito endofágico e endofílico. Ao contrário de outras espécies, *Ae. aegypti* tem hábitos diurnos, com dois picos de actividade, um a meio da manhã e outro ao fim da tarde, e alimenta-se

frequentemente de vários hospedeiros no mesmo ciclo gonotrófico (Halstead, 2008; Jansen & Beebe, 2010). Esta espécie não se dispersa por longas distâncias mantendo-se próximo do local de emergência, e, normalmente o alcance de voo não excede os 200 metros. No entanto a procura de locais de postura pode levar as fêmeas a dispersar por maiores distâncias (Bergero et al., 2013). Quanto à longevidade, as fêmeas sobrevivem entre 8-15 dias, em regra, e os machos entre 3-6 dias, embora o tempo de vida seja variável, podendo chegar até um mês, de acordo com as condições de temperatura, humidade e disponibilidade de alimento (Halstead, 2008).

1.1.1. Ciclo de vida de *Aedes aegypti*

O ciclo de vida de *Ae. aegypti* decorre em dois meios distintos: aquático, durante as fases imaturas de ovo, larva e pupa, e aéreo, na fase adulta. Como foi anteriormente referido, é um inseto holometabólico, visto que passa por metamorfoses completas durante o seu desenvolvimento (Almeida, 2011; Christophers, 1960).

Um novo ciclo é iniciado no ato de oviposição. Sendo um mosquito urbano, os biótopos larvares são essencialmente recipientes artificiais e temporários, que se encontram dentro ou fora das habitações. Os criadouros escolhidos são essencialmente peridomésticos, que podem ser pratos de vasos de plantas, quaisquer objetos que acumulem água, como pneus, embora também possam ser de origem natural, como, por exemplo, as axilas de plantas que acumulem água. A fêmea grávida após selecionar o local de postura alinha-se à superfície da água, ou na parede do recipiente, fletindo o abdómen para baixo por forma a tocar com o último segmento na água ou imediatamente acima da superfície da água. A fêmea deposita cerca de 20 ovos, e, após repouso, procura outro criadouro para repetir o processo. Deste modo, em cada postura uma fêmea utiliza, em regra, mais do que um criadouro larvar. (Christophers, 1960).

Os ovos postos são brancos e translúcidos, escurecendo gradualmente até se tornarem pretos. Na sua forma madura, os ovos têm uma forma alongada e oval, que se assemelha a um torpedo, com manchas poligonais que visualmente formam uma rede de linhas brancas. Os ovos são resistentes à dessecação e mantêm-se viáveis até um ano, característica que conjuntamente com o comportamento peridoméstico do mosquito, contribuem para a dispersão passiva da espécie para outros locais (Christophers, 1960; Jansen & Beebe, 2010).

Quando as condições são propícias, e os ovos entram em contacto com a água, as larvas eclodem após um período de 2-4 dias à temperatura entre os 25-27°C. As larvas eclodidas passam por quatro estados larvares e três ecdises. As larvas alimentam-se, por filtração, de partículas presentes na água, ou roem e deglutem partículas de maiores dimensões. No seguimento do quarto estado larvar, surge a pupa. O desenvolvimento da fase larvar, desde a eclosão do ovo até à pupa, tem um período médio de 7 dias à temperatura de 27°C. O estado de pupa é caracterizado por um período de quiescência e de rearranjo tecidular sem alimentação, que pode durar entre 2-4 dias a temperaturas entre 23-27°C. Terminado o desenvolvimento da pupa, o adulto irá emergir num processo rápido que dura entre 10-15 minutos (Christophers, 1960).

Aedes aegypti está entre as espécies de mosquitos com uma fase imatura de curta duração, cuja característica está associada à utilização de criadouros de pequenas dimensões, que podem secar rapidamente, o que promove um rápido desenvolvimento das fases imaturas. Após a emergência, os mosquitos copulam, e as fêmeas procuram realizar uma refeição de sangue para maturação ovárica dando posteriormente origem a um novo ciclo (Natal, 2002).

1.1.2. Origem e distribuição mundial

Atualmente são conhecidas duas subespécies de *Ae. aegypti*, nomeadamente *Ae. aegypti aegypti* e *Ae. aegypti formosus*. A subespécie *Ae. aegypti aegypti* é um mosquito urbano e muito antropofílico que terá evoluído da subespécie silvática *Ae. aegypti formosus*. A forma silvática e ancestral é enzoótica das florestas da África central e subsariana. É uma espécie antropofílica, que se desenvolve em criadouros naturais, como buracos de árvores e plantas. Apresenta uma tonalidade mais escura que a subespécie urbana, e distingue-se desta pela ausência de sedas brancas no primeiro tergito do abdómen (Halstead, 2008; Powell & Tabachnick, 2013).

A adaptação de *Ae. aegypti* ao meio urbano deve-se provavelmente à dispersão da forma silvática das florestas africanas para o norte de África, que, pelo contacto com as populações e recurso a criadouros artificiais terá dado origem à subespécie *Ae. aegypti aegypti* (Failloux et al., 2002; Halstead, 2008). Posteriormente, as trocas comerciais terão levado à dispersão de *Ae. aegypti* no Mediterrâneo, incluindo Portugal e Espanha, e no oeste e este de África (Failloux et al., 2002). A exploração marítima

portuguesa com o intercâmbio de mercadorias do oeste de África (ao longo da costa Africana) para a Ásia, e a importação de escravos do oeste Africano para a América levaram à dispersão de *Ae. aegypti* para o continente Americano. A adaptação do mosquito a criadouros artificiais e resistência dos ovos à dessecação permitiu que este sobrevivesse nos barcos durante as longas viagens das rotas marítimas (Failloux et al., 2002; Halstead, 2008; Powell & Tabachnick, 2013). O desenvolvimento das indústrias marítimas nos séculos XVIII e XIX levou à introdução do mosquito de África para a Austrália (Failloux et al., 2002). Já no século XX, a II Guerra Mundial com o movimento das tropas contribuiu para a dispersão de *Ae. aegypti* nas ilhas do Pacífico e sudeste Asiático (Failloux et al., 2002; Gubler, 2011).

Assim sendo, a expansão geográfica de *Ae. aegypti* tem acompanhado a globalização. O aumento da população mundial, as migrações e contínuo crescimento urbano conjuntamente com o comércio internacional têm sido responsáveis pela dispersão de *Ae. aegypti* e o seu estabelecimento em novos locais (Unlu & Farajollahi, 2012). A distribuição desta espécie encontra-se, normalmente, em latitudes entre 35°N e 35°S, correspondendo à isotérmica de inverno de 10°C, e, embora não seja comum encontrar-se acima dos 1000 metros de altitude, já foi detetado a uma altitude de 2000 metros na Índia e na Colômbia (Braga & Valle, 2007).

1.1.2.1. *Aedes aegypti* em Portugal – Ilha da Madeira

O mosquito já esteve presente em Portugal continental, tendo sido identificado desde o distrito do Porto até às províncias mais a sul, incluindo a zona de Lisboa, onde era abundante, não sendo registada a sua presença desde 1956 (Almeida et al., 2007; Almeida, 2011; Holstein, 1967).

No ano de 2004, na Ilha da Madeira começaram a surgir queixas por parte da população da freguesia de Santa Luzia, no Funchal, relativamente a um mosquito de elevada agressividade cujas picadas resultavam numa reação alérgica exacerbada com a formação de pápulas (Almeida et al., 2007). O mosquito foi identificado em 2005 como sendo *Ae. aegypti*, não havendo registos da sua presença nos rastreios entomológicos anteriores (Seixas et al., 2013). Após a identificação do mosquito, foi implementado um programa de controlo, simultaneamente com o programa de vigilância, por forma a monitorizar a densidade populacional e dispersão do mosquito na cidade do Funchal e

concelhos circundantes. Este programa decorreu entre 2006 e 2008 por forma a impedir o estabelecimento da espécie na ilha. Em 2009, verificou-se que a distribuição do mosquito já se estendia aos concelhos de Câmara de Lobos e de Santa Cruz (Gonçalves et al., 2008). A expansão de *Ae. aegypti* continuou ao longo da costa sul da ilha, abrangendo os concelhos da Ribeira Brava e Ponta do Sol, a oeste, e Santa Cruz, a este. Em 2011, o mosquito foi também detetado na costa norte da ilha no concelho de Porto Moniz, embora não se tenha estabelecido nesse local, e no ano de 2012 o mosquito foi também identificado nos concelhos da Calheta, a oeste, e Machico, a este (ECDC, 2014).

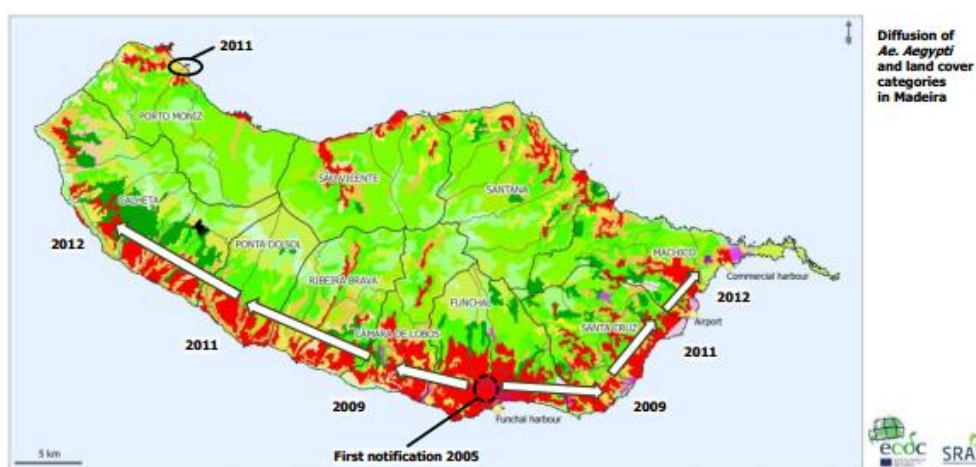


Figura 2: Expansão de *Ae. aegypti* na Ilha da Madeira desde a primeira notificação no Funchal em 2005 até 2012. (Adaptado de ECDC 2014)

A expansão de *Ae. aegypti* na Ilha da Madeira deve-se à combinação de fatores humanos e ecológicos. A densidade populacional nas áreas urbanas e a disponibilidade de criadouros artificiais peridomésticos, em conjunto com zonas verdes e vegetação subtropical ao longo da costa sul da ilha reúnem ótimas condições para a sobrevivência e estabelecimento do mosquito (ECDC, 2013). O clima na Ilha da Madeira é temperado e húmido com precipitação anual abundante e um período seco curto no verão, que ocorre principalmente no mês de Julho. As temperaturas médias anuais oscilam entre 14°C e os 18°C, que no verão variam entre os 26°C e 28°C, e no inverno podem ser superiores a 12°C (Agência Estatal de Meteorologia de Espanha & Instituto de Meteorologia de Portugal 2012). Além disso, o hábito cultural da população em manter inúmeros vasos de plantas com pratos para a coleção de água nos seus jardins, varandas e dentro das habitações, assim como a existência de casas inabitadas, sistemas de

drenagem de água, sarjetas e telhados planos, disponibilizam inúmeros potenciais criadouros para o desenvolvimento de *Ae. aegypti* (ECDC, 2013).

Relativamente à origem desta espécie na Ilha da Madeira, estudos genéticos ao ADN mitocondrial (mtADN) e aos polimorfismos associados à mutação *kdr* sugerem que este mosquito é oriundo da América do Sul, mais precisamente do Brasil ou da Venezuela. Os dados obtidos pelas análises genéticas e o movimento populacional entre a Madeira e os dois países sul americanos devido às migrações suportam a possível origem do mosquito (Seixas et al., 2013).

1.2. Importância médica de *Aedes aegypti*

Aedes aegypti é vetor de arbovírus, destacando-se o vírus da febre-amarela, o vírus da dengue e o vírus chikungunya.

1.2.1. Febre-amarela

O agente etiológico da febre-amarela (FA), tal como o nome indica, é o vírus da febre-amarela (VFA), que pertence à família *Flaviviridae*, género *Flavivirus*. A FA é uma doença infecciosa não contagiosa, que é considerada a febre hemorrágica original (Vasconcelos, 2003). Esta arbovirose foi das doenças epidémicas letais mais temidas, devido aos grandes surtos no Norte e Sul da América, África e Europa ao longo dos séculos XV-XIX, até ao desenvolvimento de uma vacina eficaz em 1930 no séc. XX (Barrett & Higgs, 2007; Bryant et al., 2007; Vasconcelos, 2003). O VFA é endémico e enzoótico nas florestas tropicais da América do Sul e África causando epidemias ou surtos isolados com impacto na Saúde Pública. Os vetores do VFA pertencem aos géneros *Haemagogus* e *Aedes*, na América Central e do Sul, e *Aedes* em África, com especial relevância para a espécie *Ae. aegypti* (Poletto et al., 2005; Vasconcelos, 2003).

Este arbovírus é originário de África e terá sido introduzido na América através das explorações marítimas e importação de escravos. A frequência do comércio internacional entre África, América e ilhas das Caraíbas levou à ocorrência de epidemias de FA na América Central e Sul, Estados Unidos e Europa, principalmente nas cidades portuárias (Barrett & Higgs, 2007; Bryant et al., 2007). Em Portugal, a última epidemia ocorreu em 1857 tendo sido registados 1800 casos e 600 mortos.

Pensa-se que *Ae. aegypti* terá sido o vector responsável por esta epidemia (P. G. de Almeida, 2011).

1.2.2. Dengue

O vírus da dengue (DENV), que tal como o VFA pertence à família *Flaviviridae*, género *Flavivirus*, pode causar uma infecção benigna, designada de febre da dengue, ou febre hemorrágica que constitui um quadro clínico grave que pode ser fatal. A infecção por DENV pode ocorrer por um dos 4 serótipos existentes, nomeadamente: DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4. Os vetores do vírus da dengue são os mosquitos das espécies *Ae. aegypti* e *Aedes albopictus* (Halstead, 2008; Silvano & Abreu, 2014).

No decorrer dos séculos XVIII e XIX as epidemias de dengue eram esporádicas, e confinavam-se aos locais recentemente povoados devido às explorações marítimas, principalmente em África, subcontinente Indiano e no Sudeste Asiático. No séc. XX surgiu a pandemia de dengue com a II Guerra Mundial, com a dispersão do vírus nas ilhas do Pacífico e Sudeste Asiático. Após a guerra, seguiu-se um exponencial crescimento urbano e económico e muitos dos países do Sudeste Asiático passaram a apresentar a co-circulação dos 4 serótipos de dengue, tendo surgido os primeiros casos de febre da dengue hemorrágica no período entre 1950-1970. No final dos anos 70, com o elevado crescimento económico na América tropical, os serótipos de dengue começaram a ser re-introduzidos a partir da Ásia, e em 1994 já co-circulavam os quatro serótipos. Após 50 anos da II Guerra Mundial têm ocorrido grandes surtos de dengue hemorrágica nas Ilhas do Pacífico, América tropical e Sudeste Asiático (Gubler, 2011; Halstead, 2008).

Actualmente, a dengue é das arboviroses transmitidas por mosquitos de mais rápida expansão no mundo. Em 2009, ocorreram anualmente 50 milhões de infecções pelo vírus da dengue, e 2,5 biliões de pessoas viviam em países onde a doença é endémica. Já em 2012 esse número aumentou, e estima-se que poderá ascender os 100 milhões de novos casos anuais nos países endémicos. Para além da contínua expansão da doença para novas áreas, têm vindo a surgir inúmeros casos severos de dengue que incluem mortes (WHO & TDR, 2009; WHO, 2012). Dado que não existe vacina ou tratamento específico da dengue o seu tratamento incide no alívio dos sintomas, e a sua

prevenção na implementação de programas de controlo vectorial dos mosquitos transmissores do vírus. O custo anual estimado para o tratamento de doentes ambulatoriais ou internados nos serviços de saúde ronda os 514–1394 US\$ por pessoa (Halstead, 2008; WHO, 2012).

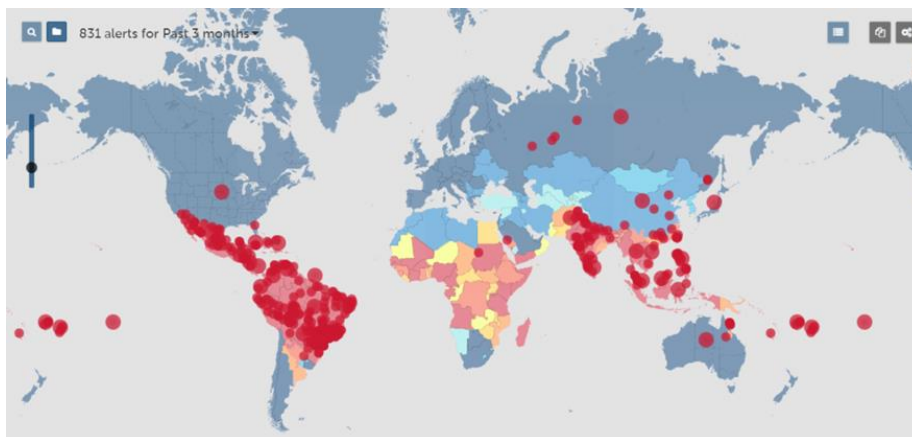


Figura 3: Mapa da distribuição mundial dos surtos de dengue (fonte: <http://www.healthmap.org/dengue/en/>, acedido em 11/02/2015)

1.2.2.1. Dengue da Ilha da Madeira

Em Setembro de 2012 foram detectados os dois primeiros casos autóctones de dengue na Região Autónoma da Madeira. No dia 3 de Outubro desse ano foi declarado o primeiro surto de dengue na Madeira, e testes realizados em laboratório pelo Instituto Nacional de Saúde de Lisboa (INSA) detectaram o serótipo DENV-1 como agente causal do surto (Alves et al., 2013; Sousa et al., 2012).

Desde a declaração do surto foi implementado um programa de vigilância epidemiológica e controlo (Sousa et al., 2012). O surto teve a duração de 12 semanas, desde 3 de Outubro de 2012 a 3 de Fevereiro de 2013. No total, foram declarados 2168 casos prováveis de dengue, dos quais 1084 foram confirmados em laboratório. O total de casos prováveis diz respeito a residentes na ilha da Madeira, e não foram identificadas manifestações graves da doença ou mortes (Rodrigues et al., 2014). O surto na Ilha da Madeira foi a primeira epidemia na Europa de que se tem registo desde 1920, e não foram registados mais casos autóctones desde que se declarou o término do mesmo (Rodrigues et al., 2014; Seixas et al., 2013).

1.2.3. Chikungunya

O vírus chikungunya (CHIKV) pertence à família *Togaviridae*, género *Alfavírus*. Os vetores que transmitem este arbovírus pertencem ao género *Aedes*, sendo que os

principais vetores em meios urbanos são as espécies *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* (Staples et al., 2009; Thiberville et al., 2013).

A origem de CHIKV será da África central e este, onde decorre o ciclo silvático entre primatas não humanos. Os primeiros casos de infecção por CHIKV em humanos ocorreram em África entre 1952-53, e resultaram numa epidemia ao longo da Tanzânia e Moçambique. A primeira epidemia de CHIKV na Ásia ocorreu em Bangkok, na Tailândia, em 1958, tendo-se seguido inúmeros surtos nas Filipinas, Camboja, Vietname, Laos, Mianmar, Malásia e Indonésia. Desde que foi identificado em 1955, têm vindo a surgir surtos epidémicos de CHIKV em vários países Africanos, na região do Oceano Índico e Sudeste asiático. Entre 2004-2006, na costa do Quênia, ocorreu um grande surto epidémico de CHIKV, que se propagou ao longo das ilhas do oceano Índico, Índia e Sudeste Asiático, tendo sido reportados inúmeros casos importados na Europa, América do Norte, e em vários países Asiáticos. Outro grande surto ocorreu entre 2005-2006 nas ilhas francesas La Reunion no oceano Índico, que afetou mais de um terço da população, seguindo-se, em 2006, uma epidemia na Índia em que foram estimados um milhão de casos. Na Europa, o primeiro surto de CHIKV decorreu em 2007 na Itália, região de Romagna, cuja origem esteve num único caso importado da Índia, com 248 casos autóctones. O vetor responsável por esse surto foi *Ae. albopictus* que já se encontrava estabelecido no país. Em 2010, foram também confirmados dois casos de transmissão autóctone em França (Cavrini et al., 2009; Staples et al., 2009; Thiberville et al., 2013).

Atualmente não existe profilaxia ou tratamento específicos para CHIKV, sendo que o tratamento incide no alívio dos sintomas, dado que a doença é autolimitada, no entanto é de difícil recuperação podendo apresentar elevados níveis de morbilidade. Embora estejam a decorrer investigações para o desenvolvimento de uma vacina, a prevenção assenta no controlo dos vetores com o objetivo de diminuir o contacto da população com os mesmos, e, consequentemente, a transmissão do vírus (Thiboutot et al., 2010).

1.3. Controlo vetorial

As doenças transmitidas por vectores constituem um risco para a saúde humana além de afetarem o desenvolvimento socioeconómico. Atualmente, a inexistência de

vacinas e o aparecimento de resistências aos fármacos disponíveis, tornam o controlo vetorial na medida primária para o controlo e prevenção dessas doenças. Esta estratégia que visa reduzir o contacto entre os vetores e as populações, a densidade populacional dos vetores e a sua sobrevivência, tem vindo a ser também afetada pelo desenvolvimento de resistências a inseticidas por parte dos vetores (WHO, 2004).

As medidas de controlo vetorial que se têm vindo a consolidar desde o início do séc. XXI são: a gestão ambiental, o controlo químico, o controlo biológico e o controlo genético (Wermelinger & Ferreira, 2013)

1.3.1. Controlo vetorial de *Aedes aegypti*

Como já foi referido anteriormente, a prevenção da transmissão da dengue assenta essencialmente no controlo dos vetores que transmitem o vírus, nomeadamente *Ae. aegypti* que é o principal vetor desta doença. O controlo de *Ae. aegypti* tem vindo a ser um desafio. No período entre 1940-1970 as densidades do mosquito na América Central e Sul foram reduzidas com sucesso através da implementação de um extenso programa de controlo. As medidas implementadas nesse programa incidiram no controlo das coleções de água e na utilização de inseticidas, que preveniram a transmissão epidémica de dengue durante 30 anos. No entanto, o sucesso rapidamente se transformou em insucesso, visto que, na ausência de epidemias de dengue, um programa extenso de controlo já não era considerado uma prioridade e terá sido abandonado. Rapidamente, no período entre 1970-1980, *Ae. aegypti* foi reintroduzido na maioria dos países de onde teria sido eliminado, levando à emergência e hiperendemicidade de dengue (Gubler, 2011; Spiegel et al., 2005).

Em 2012, a dengue foi considerada a doença vetorial transmitida por mosquitos de maior impacte no mundo. Dada a importância da dengue como epidemia global, é necessário que se tomem medidas a fim de reduzir a morbilidade e mortalidade associadas a esta doença. Sendo a dengue uma doença negligenciada, poucos esforços têm sido feitos para contrariar os seus efeitos negativos no mundo. Desta forma, foi criada, em 2012, a estratégia global para a prevenção de controlo da dengue que pretende diminuir o peso desta doença. Os objetivos específicos desta estratégia global visam reduzir a morbilidade e mortalidade em, pelo menos, 25% e 50%, respetivamente, até 2020 (WHO, 2012).

Atualmente, o controle de *Ae. aegypti* assenta essencialmente em medidas de gestão ambiental, controlo biológico e controlo químico. Os métodos utilizados na gestão ambiental assentam na remoção, alteração, destruição ou reciclagem de contentores e coleções de água passíveis de serem potenciais criadouros larvares de *Ae. aegypti* (Halstead, 2008; WHO & TDR, 2009). O controlo biológico tem vindo a ser efetuado a partir da introdução de predadores das formas imaturas do mosquito, nomeadamente espécies de peixes larvívoras e de copépodes ciclopóides, que são pequenos crustáceos de água doce (WHO & TDR, 2009). Por último, o controlo químico têm sido a estratégia mais utilizada (Berg et al., 2012), à qual se irá prestar especial ênfase de seguida.

Os programas de controlo devem considerar os fatores ecológicos e biológicos do mosquito, o contexto cultural e fatores socioeconómicos onde são implementados, assim como os recursos disponíveis para a sua aplicação, a fim de serem sustentáveis e executados em tempo útil (WHO & TDR, 2009).

1.3.2. Controlo químico

O controlo químico tem sido das medidas de controlo mais utilizadas para o combate de vetores, para prevenir a transmissão de doenças vectoriais principalmente aquelas que são transmitidas por mosquitos (Berg et al., 2012).

A utilização de compostos químicos é a ferramenta que tem vindo a ser mais amplamente utilizada no combate ao mosquito *Ae. aegypti*. O controlo químico pode ser implementado através da utilização de larvicidas e adulticidas, que são inseticidas direcionados para o combate das formas imaturas e adultas respetivamente. A aplicação de larvicidas incide num controlo focal, e são principalmente utilizados no tratamento de contentores peridomésticos. Outro tipo de tratamento é o residual, peri-focal, através da utilização de *sprays* que afetam não só as formas imaturas como as adultas, não devendo ser utilizados em contentores de água potável. A utilização de larvicidas deve ser considerada como uma medida complementar à gestão ambiental, que se deve restringir aos contentores que não podem ser eliminados ou geridos. Por último há a pulverização espacial de adulticidas, que é recomendada na presença ou eminência de uma epidemia, cuja aplicação massiva visa uma rápida diminuição da população vetora adulta (Manjarres-Suarez & Olivero-Verbel, 2013; WHO & TDR, 2009).

Existem quatro grandes classes de inseticidas mais comumente utilizados no controlo vetorial: organoclorados, organofosforados, carbamatos e os piretróides. Mais recentemente, tem-se explorado a possibilidade de utilizar compostos químicos mimetizantes dos reguladores de crescimento de insetos (RCI), que diferem das restantes classes referidas por interferirem no desenvolvimento dos insetos (Manjarres-Suarez & Olivero-Verbel, 2013; Tunaz & Uygun, 2004).

1.3.2.1. Organoclorados

Os organoclorados (OC) contêm carbono, hidrogénio e cloro na sua composição química. Dentro desta classe salienta-se o grupo dos difenil-alifáticos, do qual se destaca o dicloro-difenil-tricloroetano (DDT) (Braga & Valle, 2007). O DDT foi sintetizado em 1874, e as suas propriedades inseticidas descobertas em 1939. Este químico foi amplamente utilizado no decorrer da II Guerra Mundial, século XX, no combate à malária, febre tifoide, e piolhos (Crinnion, 2000). Este inseticida foi o primeiro de longa duração a ser produzido, e permanece ativo durante meses após a sua aplicação nas habitações. Embora o mecanismo de ação do DDT não seja inteiramente compreendido, sabe-se que este tem ação neurotóxica por interferir com os canais de sódio, abrindo-os, o que, consequentemente, afeta o equilíbrio iónico de sódio-potássio e impossibilita a normal transmissão dos impulsos nervosos. Os OC têm sido amplamente utilizados no controlo de pestes e em programas de controlo de doenças transmitidas por vetores, como no caso da malária, no entanto a sua utilização tem vindo a ser descontinuada e proibida. Estes químicos são compostos orgânicos persistentes, tóxicos por contato e ingestão, que se acumulam nos tecidos biológicos além de persistem no meio ambiente. As restrições atualmente impostas quanto à utilização de OC incidem principalmente na sua aplicação agrícola, embora a OMS ainda os recomende para o controlo de vetores (Braga & Valle, 2007; WHO, 2011c).

1.3.2.2. Organofosforados

Os inseticidas que contêm fósforo na sua composição química denominam-se de organofosforados (OP) (Braga & Valle, 2007). Estes químicos foram sintetizados em 1820, no entanto as suas propriedades inseticidas foram descobertas posteriormente aos organoclorados, tendo sido utilizados pela primeira vez como pesticidas entre 1941-

1944 (Crinnion, 2000). Esta classe é muito utilizada no âmbito da Saúde Pública por apresentarem vantagens relativamente aos OC, visto que não se acumulam nos tecidos biológicos e são biodegradáveis. Apesar disso, têm uma toxicidade mais elevada, mesmo em menores concentrações, e são menos estáveis o que significa que têm de ser reaplicados com maior frequência (Braga & Valle, 2007). Os OP interferem com a transmissão axonal dos neurónios por inibição irreversível da enzima acetilcolinesterase (AChE). A inibição da AChE leva à acumulação do neurotransmissor acetilcolina, o que faz com que o sistema nervoso seja continuamente estimulado. Este mecanismo vai desencadear um processo de paralisia que leva à morte do inseto (Braga & Valle, 2007; Crinnion, 2000). Dos inseticidas OP destaca-se o *temephos*, que é maioritariamente usado como larvicida em diversos ambientes aquáticos. Devido à sua baixa toxicidade em mamíferos, é recomendado pela OMS para ser aplicado na água para consumo humano, na concentração máxima de 1mg/L, como medida de controlo de mosquitos (WHO, 2011a).

1.3.2.3. Carbamatos

Os carbamatos, como o *bendiocarb*, derivam do ácido carbâmico. Esta classe de inseticidas começou a ser produzida em 1960, e, como os inseticidas OP, o seu mecanismo de ação incide na enzima AChE. À semelhança com os inseticidas OP, os carbamatos atuam rapidamente sobre os insetos e possuem um reduzido poder residual, são biodegradáveis e não se acumulam em tecidos biológicos. A principal diferença dos carbamatos face aos OP é que a inibição da AChE é reversível, sendo que os insetos podem recuperar da ação destes inseticidas quando expostos a doses reduzidas (Braga & Valle, 2007; Manjarres-Suarez & Olivero-Verbel, 2013).

1.3.2.4. Piretróides

Os piretróides (PY) são uma classe de inseticidas sintéticos mais recentes, sintetizados na década de 1970, a partir do composto natural das flores de *Chrysanthemum cinerariaefolium*, o piretro. Estes químicos têm vindo a ser amplamente utilizados devido às suas elevadas propriedades inseticidas a doses reduzidas, além de serem biodegradáveis e não cumulativos. Além disso, a sua toxicidade é reduzida nos mamíferos, embora esta seja elevada para a fauna aquática. Os PY são utilizados como

inseticidas domiciliários, principalmente impregnados nas redes mosquiteiras como medida de controlo de doenças transmissíveis por vetores. O mecanismo de ação dos PY é semelhante ao do DDT, atuando nos canais de sódio, abrindo-os, afetando o sistema nervoso dos insetos (Braga & Valle, 2007; Costa et al., 2008).

1.3.2.5. Reguladores de crescimento de insetos

Os reguladores de crescimento de insetos (RCI), ao contrário de outros inseticidas sintéticos, interferem com processos fisiológicos que estão envolvidos no desenvolvimento dos insetos, por mimetização da hormona juvenil (HJ), e são bastante seletivos. Esta classe de químicos não necessita de ser tóxico para o organismo alvo, mas a sua ação resulta na ocorrência de anormalidades no decorrer do desenvolvimento dos insetos, que interferem com a sua sobrevivência (Staal, 1975; Tunaz & Uygun, 2004).

No ciclo de vida dos insetos ocorrem períodos que são sensíveis, ou insensíveis, à ação da HJ. O crescimento e desenvolvimento dos insetos são regulados por duas hormonas, a ecdisona e a HJ. A ecdisona é secretada pela glândula prótorácica, cuja ação inicia e regula o processo de muda entre os vários estádios larvares, enquanto que a HJ é secretada pela glândula endócrina *corpus allata*, que desempenha um papel essencial do processo de metamorfose e desenvolvimento embrionário. A HJ está presente durante a fase larvar, regulando a ação da ecdisona, o que permite a ocorrência das ecdises sem que seja iniciado o processo de metamorfose. No decorrer do último estado de larva, a HJ declina para níveis muito baixos, por cessação do *corpus allata*. O decréscimo da HJ leva à estimulação e libertação da ecdisona, que, na ausência de HJ, vai interromper a fase de alimentação da larva e iniciar a fase de pupa. Nos insetos holometabólicos, como no caso dos mosquitos, os níveis de HJ voltam a subir na fase de pré-pupa com o objetivo de prevenir a metamorfose precoce de alguns tecidos. De seguida, os níveis de HJ decrescem novamente, e aumenta a segregação da ecdisona, que leva ao rearranjo e diferenciação tecidular para o desenvolvimento da fase adulta e emergência do mosquito (Riddiford, 2012; Sláma, 1971; Staal, 1975).

O crescimento e desenvolvimento dos insetos estão intimamente dependente da regulação de ecdisona e HJ, além de outras neuro-hormonas. Qualquer distúrbio de origem externa por análogos sintéticos na homeostasia de uma, ou mais hormonas,

poderá resultar num desenvolvimento e crescimento anormal no inseto alvo (Dhadialla et al., 1998).

1.3.2.5.1. Piriproxifeno

Existem vários RCI, no entanto, neste trabalho, dá-se destaque ao piriproxifeno (PPF). Piriproxifeno é um químico que mimetiza a HJ dos insetos, sendo, por isso, considerado um análogo da HJ dos insetos. Este químico exerce a sua ação nos processos de morfogénese, reprodução e embriogénese. Os efeitos morfogénicos ocorrem principalmente na transição da fase de larva para pupa, onde mecanismo é regulado pelo aumento da segregação da hormona ecdisona e ausência da HJ. A persistência de um análogo da HJ durante esta transição irá causar um distúrbio nessa fase do ciclo de vida. Piriproxifeno é considerado um larvicida dado que a morte ocorre na fase imatura, principalmente na fase de pupa, sendo tal, por vezes, denominado de pupicida, o que leva à inibição da emergência dos adultos (Dhadialla et al., 1998; Invest & Lucas, 2008).

Piriproxifeno é um regulador do crescimento de insetos de largo espectro que pode ser utilizado como larvicida no controlo de pestes e vetores. Este químico é considerado seguro dado que foi avaliado como sendo não genotóxico ou carcinogénico, de baixa toxicidade para mamíferos (WHO, 2011a), embora moderadamente tóxico para peixes, e muito tóxico para zooplâncton (IPCS & IOMC, 2010). A dose recomendada pela OMS para a utilização de PPF em contentores de água potável é de 0,01mg/l (WHO, 2011a) sob a fórmula de grânulo (WHOPES, 2013).

1.3.2.5.1.1. Piriproxifeno para o controlo de *Aedes aegypti*

O controlo vetorial direcionado para mosquitos que habitam zonas urbanas ou semi-urbanas têm levado ao desenvolvimento de novas iniciativas que combinem medidas de controlo das formas adulta com metodologias que incluam a utilização de larvicidas. A escolha de um larvicida a ser utilizado num programa de controlo vetorial deve reunir os seguintes critérios: ter baixa toxicidade para mamíferos, reduzido impacto ambiental e longo efeito de ação, para reduzir o número de aplicações (Invest & Lucas, 2008).

Piriproxifeno é um larvicida que reúne os critérios acima mencionados, que tem a particularidade de não só interferir com o desenvolvimento e causar a morte das fases imaturas, inibindo a emergência dos adultos, como interfere na reprodução (Invest & Lucas, 2008; Ohba et al., 2013). A utilização de PPF é particularmente indicada para o controlo do mosquito *Ae. aegypti*, que pode ser aplicado nos criadouros artificiais, mesmo em contentores de água que se destinem para o consumo humano (WHO, 2011a; WHOPES, 2006).

O principal desafio na implementação de medidas de controlo é conseguir uma cobertura suficiente da população de mosquitos. A gestão de biótopos larvares para ser efetiva deve incidir o seu impacto na densidade da população de mosquitos que se pretende controlar. A utilização de larvicidas no controlo de *Ae. aegypti* pode contribuir para diminuir a transmissão da dengue, no entanto a sua aplicação é um desafio dada a dificuldade em identificar e atingir uma cobertura total dos criadouros, que nas áreas urbanas são essencialmente pequenos contentores peri-domésticos de grande variedade (Devine et al., 2009).

A utilização de PPF no controlo de *Ae. aegypti* incide numa estratégia que visa explorar os comportamentos inatos dos mosquitos. Esta nova abordagem está assente no pressuposto de que mosquitos expostos a uma superfície contaminada com PPF são capazes de o auto-disseminar para os seus próprios criadouros. A estratégia denominada de “auto-disseminação” explora, desta forma, os comportamentos associados à oviposição e repouso dos próprios mosquitos para que este larvicida seja disseminado. Assim, é o próprio mosquito que dispersa este químico que afeta as formas imaturas presentes nos criadouros que são contaminados, assim como a descendência que advém dos ovos postos nesses mesmos criadouros (Caputo et al., 2012; Devine et al., 2009). A exposição da população de mosquitos ao larvicida é conseguida através da utilização de estruturas artificiais, denominadas de estações de disseminação, que simulam criadouros de mosquitos, atraindo-os. Os mosquitos, após entrarem em contato com a superfície contaminada com PPF nas estações de disseminação, vão transportar no seu corpo e patas partículas de PPF que irão disseminar para outros criadouros no ato de oviposição ou repouso. Esta estratégia, quando direcionada para mosquitos transmissores da dengue, nomeadamente *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus* é potenciada pelo comportamento de oviposição destas espécies, dado que estes distribuem os ovos de uma mesma postura

por vários criadouros. As características comportamentais do mosquito *Ae. aegypti*, em conjunto com as reduzidas doses de atuação de PPF (Caputo et al., 2012), CL50=0,011 p.p.b. (Itoh et al., 1994), e o fato deste larvicida não ter efeitos repelentes nem afetar a longevidade e comportamentos das fases adultas (Devine & Killeen, 2010), reúnem condições para que esta abordagem seja promissora no controlo deste vetor nas áreas urbanas. Esta abordagem tem o potencial de atingir uma maior cobertura de criadouros, cuja é difícil através dos métodos convencionais de aplicação de larvicidas (Caputo et al., 2012).

1.3.3. Controlo vetorial de *Aedes aegypti* na Ilha da Madeira

As medidas de controlo vetorial direccionadas para o mosquito *Ae. aegypti* na Ilha da Madeira começaram a ser implementadas após a identificação desta espécie na região, que podem ser divididas por dois períodos: pré-surto (2005-2012) e surto (2012). As primeiras medidas implementadas incidiram na utilização de inseticidas e implementação de campanhas de sensibilização para prospeção e redução de biótopos larvares do mosquito (ECDC, 2014). As medidas de controlo químico, que decorreram entre 2006 e 2008, foram direccionadas para as fases adulta e larvar, e consistiram na pulverização intradomiciliar com alfa-cipermetrina (Fendona®), nebulização ULV (Ultra-Low-Volume) extradomiciliar com tetrametrina e d-fenotrina (Killigerm® ULV500), tratamento de espaços públicos e armazéns com piretrina (Pybuthrin®), e aplicação de *Bacillus thuringiensis* subespécie *israelensis* (*Bti*) em contentores com água estagnada (Melim, 2009). Entre 2009-2010, foram realizados testes de suscetibilidade a inseticidas, recorrendo aos protocolos da OMS, por forma a averiguar se a população de *Ae. aegypti* na Madeira era resistente a inseticidas, cujo tema será explorado mais adiante.

Após terem surgido os primeiros casos de dengue na Madeira em 2012, as medidas de controlo foram amplificadas. Relativamente ao controlo das fases imaturas, voltou-se a incidir na procura e eliminação de criadouros e aplicação de *Bti*, além de se ter iniciado a deposição de sal e água salgada nas sargetas e sistemas de drenagem de água para eliminação das formas larvares. Quanto ao controlo da fase adulta, recorreu-se novamente à aplicação de adulticidas, através de pulverizações e nebulizações extradomiciliares, e nebulizações intradomiciliares. Em conjunto foram implementadas

campanhas informativas sobre a redução das fontes de *Ae. aegypti* e proteção contra picadas de mosquito com a promoção da utilização de repelentes (ECDC, 2014). No sentido de aumentar a eficácia das medidas até então implementadas, em Dezembro de 2012, a Câmara Municipal do Funchal desenvolveu e implementou o Plano Municipal de Combate ao Mosquito Vetor de Transmissão da Dengue, que teve por objetivo contribuir para o combate do surto de dengue através da eliminação dos focos de mosquitos com envolvimento da população residente. A intervenção foi desenvolvida para ser aplicada durante dois anos, e cobriu toda a área urbana do concelho do Funchal (Câmara Municipal do Funchal 2015).

Em conjunto com as medidas desenvolvidas por forma a controlar o mosquito *Ae. aegypti*, e o surto, foram tomadas precauções no sentido de impedir a exportação do mosquito para território continental. Desde 2005 que têm sido publicados documentos com recomendações e medidas de controlo vetorial que foram adoptadas nos portos e aeroportos, assim como diretrizes para o transporte de lixo, como pneus e embalagens, além de produtos de exportação, tais como bananas e plantas (ECDC, 2014).

1.4. Vigilância entomológica de *Aedes aegypti* na Ilha da Madeira

A vigilância entomológica de *Ae. aegypti* teve início em 2005, após a identificação do mosquito na Ilha da Madeira. Inicialmente, foram distribuídas armadilhas de oviposição, *ovitrap*s, no município do Funchal para monitorizar a população adulta do mosquito. A rede de vigilância por intermédio de *ovitrap*s foi progressivamente aumentada até ao aeroporto, localizado em Água de Pena, e ao porto comercial, que se encontra no Caniçal (ECDC, 2014).

No ano de 2009, foi aprovado o projeto MOSQUIMAC – Gestão Integrada do vetor *Aedes aegypti*, do programa Madeira-Açores-Canárias (MAC) 2007-2013, e foram introduzidas novas *ovitrap*s, 27 no Funchal e 18 distribuídas nos restantes 10 concelhos, para dar continuidade ao programa de monitorização. Nesta fase, foram também iniciados ensaios com novas armadilhas, desta vez direccionadas para a captura de adultos (Funchal, n.d.). Para compreender a dispersão e distribuição de *Ae. aegypti* na Ilha da Madeira e em Porto Santo, foi realizado um estudo transversal, em 2011, recorrendo às *ovitrap*s que foram distribuídas por todo o território da Ilha da Madeira. e

verificou-se que o mosquito já se tinha expandido para oeste da ilha, e não foi detetada a sua presença em Porto Santo (ECDC, 2014).

No ano seguinte, em 2012, foi iniciada a vigilância por intermédio de armadilhas *Biogents-Sentinel Traps*® (BGs) direcionadas para a captura de adultos. Para além da colheita semanal de ovos nas *ovitrap*s que se encontravam distribuídas na ilha até então, foram distribuídas 15 armadilhas BGs, 13 no concelho do Funchal e 2 no concelho de Câmara de Lobos. A colheita dos exemplares nestas armadilhas ocorreu com a frequência de dois dias por semana. Em adição, a Rede de Vigilância de Vetores (REVIVE), no âmbito do Programa Nacional de Vigilância de Vetores e Culicídeos, passou a efetuar, nos meses de Julho, Setembro e Novembro, realizou uma atividade bimestral de captura de exemplares adultos de *Ae. aegypti* para estudar e caracterizar a população dessa espécie presente na Ilha da Madeira (IASAÚDE, 2012).

Face à ocorrência do surto de dengue na região, as medidas de vigilância foram aumentadas, tendo sido distribuídas 135 *ovitrap*s nas localidades com maior densidade de mosquitos, e as armadilhas BGs passaram a ser monitorizadas diariamente. Para além da colheita de dados por intermédio destes dois tipos de armadilhas, foram elaborados estudos entomológicos de porta em porta para estimar os índices de infestação de *Ae. aegypti* nas habitações. A prospeção de sargetas e sistemas de drenagem de água foi também efetuada por forma a identificar a presença de formas imaturas de *Ae. aegypti* e identificar potenciais criadouros larvares (ECDC, 2014).

Após término do surto, as armadilhas *ovitrap*s e BGs continuaram a ser utilizadas para a monitorização da população de *Ae. aegypti* na Ilha da Madeira. As capturas de ovos e exemplares adultos são registadas semanalmente em bases de dados para o efeito.

1.5. Resistência a inseticidas

O controlo químico é a estratégia mais utilizadas no controlo de mosquitos vetores de doenças. Os inseticidas da classe dos piretróides, por exemplo, têm sido os mais utilizados nas pulverizações intra-domiciliares em todo o mundo, além de serem utilizados para tratar redes mosquiteiras (Liu, 2015). O aparecimento e aumento de resistências a inseticidas tornam necessário que se desenvolvam estratégias efetivas de controlo, visto que o número de populações de mosquitos resistentes tem vindo a

aumentar, o que, por sua vez, diminui os recursos inseticidas disponíveis. Avanços no conhecimento da bioquímica, genética molecular, ecologia, dinâmica populacional e monitorização das espécies de mosquitos vetores de doenças têm sido cruciais para que se possam desenvolver estratégias alternativas e contornar o problema crescente das resistências a inseticidas. Desta forma, a seleção de uma estratégia de controlo deve incidir no conhecimento das resistências referentes aos inseticidas que são selecionados para aplicar numa determinada população vetora, assim como da biologia e ecologia da espécie em questão (Georghiou, 1994).

O termo “resistência” é definido como “a habilidade de uma população vetora de insetos tolerar uma dose de inseticida que, em condições normais, causaria a sua morte”. A resistência é uma característica genética (Braga & Valle, 2007), que pode ser natural, sendo um fenómeno pré-adaptativo da ocorrência de variações genéticas que conferem a capacidade de resistência sem que tenha ocorrido exposição prévia ao inseticida (Liu, 2015), ou adquirida, quando é desenvolvida a capacidade de resistência posteriormente à exposição. Assim, são identificadas três causas que podem levar à resistência numa população vetora: a exposição do mosquito a doses sub-letais de inseticidas, a seleção natural devido à pré-existência de genes que conferem resistência e permitem a sobrevivência dos exemplares resistentes na presença dos inseticidas, e, por último, a ocorrência de mutações genéticas após exposição aos agentes químicos (George, 1957).

As alterações genéticas que conferem resistência aos inseticidas podem ocorrer por mecanismos de destoxicação de inseticidas (resistência metabólica), ou por perda de sensibilidade nos locais alvo (resistência local-alvo). A resistência metabólica é a mais comum e consiste em mecanismos de destoxicação de xenobióticos que são degradados, através de vias enzimáticas, em moléculas não tóxicas. As enzimas que estão envolvidas no metabolismo dos xenobióticos encontram-se divididas por enzimas de Fase I e enzimas de Fase II. As enzimas de Fase I, como as do citocromo P450 e esterases, desempenham a função de reconhecer e atuar diretamente sobre o composto exógeno, como um inseticida, metabolizando-o no substrato que será utilizado pelas enzimas de Fase II, como as glutatíon-S-transferases. Os inseticidas descritos anteriormente neste trabalho atuam no sistema nervoso central dos insetos. A resistência local-alvo resulta da ocorrência de mutações pontuais ou modificações estruturais no sítios-alvo que interagem com os inseticidas, o que impede que estes se consigam ligar ao composto

exógeno. Este mecanismo de resistência está associado a alterações: na enzima acetilcolinesterase (AChE), que degrada a acetilcolina, neurotransmissor que promove a propagação do impulso nervoso; nos canais de sódio, que permitem a transmissão dos impulsos nervosos; e, por último, nos recetores do ácido gama-aminobutírico (GABA) que estão envolvidos no controlo neuromuscular (Braga & Valle, 2007; Liu, 2015).

1.5.1. Resistência a inseticidas na população de *Aedes aegypti* na Ilha da Madeira

O aparecimento e expansão das resistências a inseticidas nas populações de mosquitos vetores, como em *Ae. aegypti*, constitui uma preocupação constante relativamente ao controlo de doenças transmissíveis por esses mesmos vetores. Atualmente, as medidas mais utilizadas nos programas de controlo assentam essencialmente na utilização de duas das quatro classes de inseticidas disponíveis, nomeadamente os piretróides e organofosfatos. Assim, é importante que haja conhecimento e monitorização das resistências a inseticidas na população vetora alvo, para que se possam implementar estratégias de controlo adequadas e eficazes (Ranson et al, 2010).

O controlo vetorial de *Ae. aegypti* na Madeira incluiu, no decorrer dos anos 2009-2010, a pesquisa de resistências a vários inseticidas recorrendo aos testes de suscetibilidade da OMS e de garrafa CDC, direccionados para as formas adultas (Seixas, 2012).

Os inseticidas testados nos testes de suscetibilidade da OMS foram: DDT (4%), malatião (5%), permetrina (0,75%) e deltametrina (0,05%). Os resultados revelaram que a população de *Ae. aegypti* da Madeira é resistente ao DDT e à deltametrina, com taxas de mortalidade de 29,4% e 65,2% respetivamente, moderadamente resistente à permetrina e suscetível ao malatião, com mortalidade de 33,3% e 99,0% respetivamente (ECDC, 2014; Seixas, 2012).

Os canais de sódio são os principais alvos dos inseticidas piretróides e DDT, que ao ligarem-se mantêm os canais na sua conformação aberta, o que resulta na propagação contínua do impulso nervoso, que pode levar à morte do inseto. O mecanismo de resistência local-alvo associado aos canais de sódio resulta numa dessensibilização a esses inseticidas que já não se conseguem ligar aos mesmos. Este mecanismo de

resistência resulta de mutações pontuais, conhecidas como resistência *knockdown*, ou mutações *kdr*. Devido à resistência cruzada entre os inseticidas DDT e piretróides (Braga & Valle, 2007), a identificação das resistências segundo os ensaios de suscetibilidade a inseticidas realizados, sugere a existência de mutação do tipo *kdr*. No entanto, a data de 2012 apenas uma mutação *kdr* tinha sido identificada na população de *Ae. aegypti* da Ilha da Madeira. Esta mutação estando presente numa muito baixa frequência alélica nos mosquitos testados (6%) remete para a existência de outros mecanismos que conferem as resistências ao DDT, à permetrina e deltametrina (ECDC, 2014; Seixas, 2012).

Entre 2013 e 2014, foram realizados ensaios direcionados para as formas larvares, a fim de testar os efeitos inseticidas de outros produtos, alguns dos quais já tinham sido utilizados no controlo vetorial de *Ae. aegypti* na Madeira, tais como: cloreto de sódio (sal), espinosade (Spintor® 480 SC, 480 g/L IA, Dow Agrosiences), *Bacillus thuringiensis* subespécie *israelensis*, serotipo H14 (*Bti*) (Vectobac® G, 2,8% AI, 200 UTI/mg, Valent Biosciences) e PPF (PPF®; padrão analítico >99%, lote SZBC220XV, Sigma-Aldrich). Relativamente ao cloreto de sódio (sal), os resultados sugerem que alterações na salinidade dos criadouros podem eliminar as formas imaturas de *Ae. aegypti*, ainda que não se conheçam as concentrações de sal nos biótopos larvares na região da Madeira. Quanto ao espinosade, foi observada uma diminuição da sensibilidade a este composto, o que poderá advir da exposição de concentrações sub-letais a este larvicida, ou da tolerância pré-existente da população de *Ae. aegypti* que foi introduzida na Madeira. O *Bti* demonstrou ser eficaz, dado que os resultados obtidos sugerem a suscetibilidade da população de *Ae. aegypti* da Ilha da Madeira a este composto na sua formulação comercial Vectobac® G. Por último, os ensaios preliminares para determinar a suscetibilidade ao PPF demonstraram que a mortalidade larvar para a população da Madeira foi de 5% e que o efeito pupicida foi observado para todas as doses testadas (G. Alves, 2014).

2. OBJETIVOS

Desde que o mosquito *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) foi identificado na Ilha da Madeira, em 2005, que as autoridades locais têm vindo a implementar medidas de controlo vetorial, por forma a minimizar a densidade da população desta espécie e evitar a sua expansão na região.

No entanto, o mosquito rapidamente se dispersou ao longo da costa sul da ilha, e a identificação de resistências a inseticidas em conjunto com a dificuldade na eliminação de biótopos larvares, têm dificultado o sucesso das medidas de controlo até então aplicadas.

O primeiro surto de dengue na ilha decorreu em 2012, e, apesar de não terem sido identificados mais casos autóctones de dengue desde o término do mesmo, a presença de *Ae. aegypti* na Madeira constitui um risco constante para o surgimento de novos surtos da doença, provocada pelo mesmo serotipo (DENV-1) ou por um dos restantes três. Deve-se, também, considerar a possibilidade da introdução de outros arbovírus, como o vírus da febre-amarela, e o vírus chikungunya.

Assim, foi proposto no âmbito de Tese de Mestrado em Ciências Biomédicas – Especialidade em Parasitologia Médica, lecionado no Instituto de Higiene e Medicina Tropical – Universidade Nova de Lisboa, explorar uma nova abordagem de controlo vetorial através da implementação de um pequeno estudo piloto, que incide na utilização de um larvicida análogo da hormona juvenil dos insetos, o piriproxifeno. Para isso, foram traçados os seguintes objetivos.

2.1. Objetivo geral

Avaliar a eficácia da auto-disseminação de piriproxifeno pela população de *Ae. aegypti* (L. 1762) na freguesia do Paúl do Mar, concelho da Calheta, na Ilha da Madeira, como metodologia de controlo vetorial.

2.2. Objetivos específicos

- Otimização da metodologia a aplicar no Paúl do Mar
 - a) Avaliar a eficácia das armadilhas *Biogents Gravid Aedes Trap*® (GAT) e *Biogents-Sentinel Trap*® (BGs) para a colheita de

- exemplares de *Ae. aegypti* na área em estudo no Paúl do Mar e, também, em Santa Luzia;
- b) Realizar testes de suscetibilidade a adulticidas à população local de *Ae. aegypti* segundo os testes padronizados da OMS (WHO, 2013);
 - c) Testar a eficácia das redes impregnadas com inseticida das armadilhas GAT segundo os testes padronizados da OMS, como complemento ao passo a), para a monitorização da durabilidade de redes impregnadas com inseticidas (WHO, 2011b);
 - d) Avaliar as armadilhas BGs como meio de disseminação de piriproxifeno na área em estudo.
- Estudo piloto de auto-disseminação de PPF no Paúl do Mar
 - a) Disseminação de piriproxifeno (Sumilarv 0,5G®) na área em estudo no Paúl do Mar;
 - b) Avaliação da densidade de mosquitos após a disseminação de piriproxifeno.
- Bioensaio de transferência de piriproxifeno de mosquitos *Ae. aegypti* machos para fêmeas

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Ilha da Madeira

A Região Autónoma da Madeira (RAM) é um arquipélago de território nacional que está localizado no oceano Atlântico e a sudoeste da Península Ibérica, a cerca de 1000km de Portugal continental e 500km da costa norte africana, entre as latitudes 32°38' e 32°52' N, e longitudes 16°39' e 17°16' W. A RAM é constituída por duas ilhas habitadas, a ilha da Madeira, maior e principal ilha do arquipélago, e a ilha de Porto Santo, e pelas ilhas Desertas (Ilhéu Chão, Deserta Grande e Bugio) e Selvagens (Selvagem Grande, Selvagem Pequena e Ilhéu de Fora), desabitadas (Borges et al., 2008; Gonçalves et al., 2008; Sousa et al., 2012).

A RAM tem 267 785 habitantes e é constituída por 11 municípios, 10 na ilha da Madeira, e 1 na ilha de Porto Santo (INE, 2012). De acordo com a classificação climática de Köppen-Geiger o clima na ilha da Madeira é do tipo temperado a subtropical com verões secos, poucas oscilações de temperatura ao longo do ano, que normalmente varia entre os 15°C no inverno e 25°C no verão, e humidade relativa de 70% (Gonçalves et al. 2008; Agência Estatal de Meteorologia de Espanha & Instituto de Meteorologia de Portugal 2012).

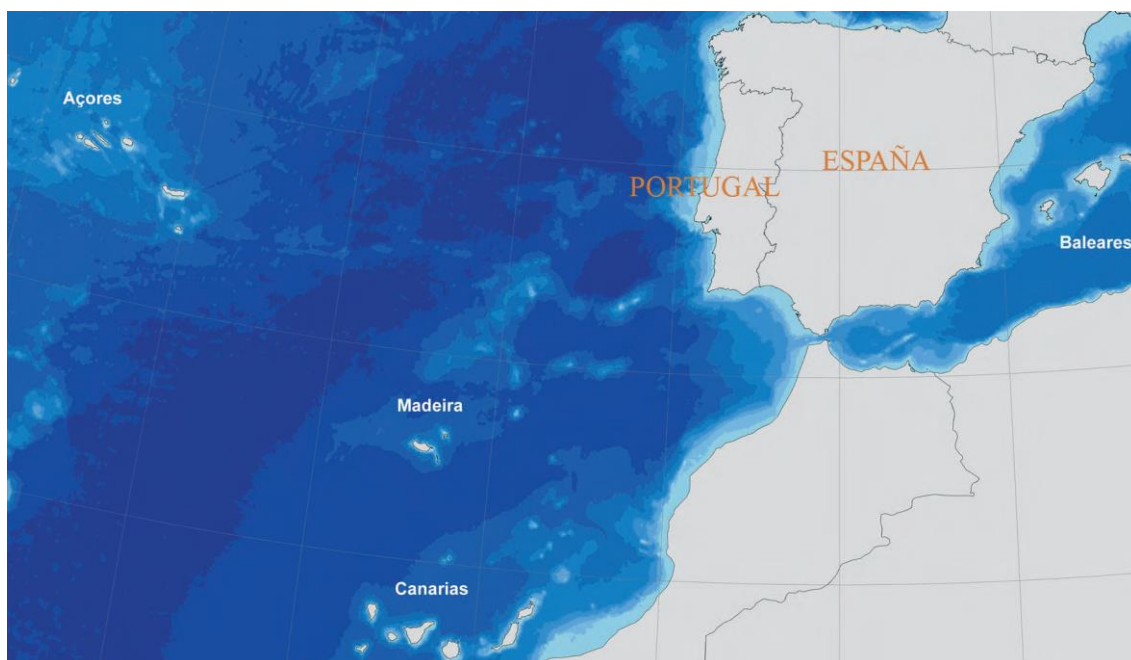


Figura 4: Localização geográfica do arquipélago da Madeira

3.1.1. Concelho da Calheta - Freguesia do Paúl do Mar

A implementação do estudo piloto de auto-disseminação de PPF decorreu na freguesia do Paúl do Mar, situado no concelho da Calheta. O concelho da Calheta está localizado entre o sul e o extremo oeste da ilha da Madeira, onde residem 11 521 pessoas. É o maior concelho do arquipélago que abrange uma área de 111,5 km², o que corresponde a 15% da superfície da ilha. Do concelho da Calheta fazem parte 8 freguesias, nomeadamente: Arco da Calheta, Calheta, Estreito da Calheta, Jardim do Mar, Paúl do Mar, Prazeres, Fajã da Ovelha e Ponta do Pargo (DREM 2011; Câmara Municipal da Calheta 2015). A freguesia do Paúl do Mar é a segunda menor freguesia do concelho da Calheta, com 1,40km², onde residem 868 pessoas (DREM, 2011). O Paúl do Mar foi o local escolhido para a implementação do estudo piloto de auto-disseminação de PPF não só por ser uma aldeia isolada, situada entre o mar e falésias, cujos acessos são um túnel de aproximadamente 2km, a este, e uma estrada, a norte, como também devido às elevadas densidades do mosquito *Ae. aegypti* no ano de 2013.

Legenda: 1- Arco da Calheta; 2- Calheta; 3- Estreito da Calheta; 4- Prazeres; 5- Jardim do Mar; 6- Paúl do Mar; 7- Fajã da Ovelha; 8- Ponta do Pargo



Figura 5: Concelho da Calheta e as respetivas freguesias. (Imagem adaptada do Roteiro Turístico do Concelho da Calheta: <http://www.cmcalheta.pt/wordpress/?p=518>, acedido a 16/03/2015).



Figura 6: Freguesia do Paúl do Mar (fonte: Google Maps, imagem de satélite).

3.2. Colónia de mosquitos

Foram implementadas e mantidas três populações de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae) nos insectários da Direção Regional de Agricultura e Desenvolvimento Rural da RAM (DRADR-RAM) em condições ótimas de temperatura ($26\pm 2^{\circ}\text{C}$), humidade relativa ($70\pm 5\%$ HR) e fotoperíodo (12h/12h claro/escuro).

A população de referência utilizada foi Rockefeller (Rock), que tem sido mantida em insectário desde 1930, e, por isso, não apresenta quaisquer mecanismos de resistência a inseticidas (Kuno, 2010). A colónia de referência foi iniciada a partir de ovos cedidos pelo “*Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas*”. As duas colónias de estudo, população do Funchal (Fx) e população do Paúl do Mar (PdM), foram obtidas a partir de ovos colhidos em armadilhas *ovitrap*s, para posturas, que se encontram distribuídas na cidade do Funchal e na freguesia do Paúl do Mar e que são monitorizadas pelas equipas da Unidade de Saúde Ambiental do IASAÚDE. Os ovos colhidos, após contagem e identificação morfológica, foram levados para os insectários da DRADR-RAM. Os ovos da população Fx foram colhidos entre as semanas 26 e 48, e os ovos da população PdM entre as semanas 26 e 40.

Os ovos pertencentes às três populações foram mergulhados em tinas de plástico com água desclorada para eclosão das larvas, que foram alimentadas com flocos para peixes de água quente Sera Vipan®. Os adultos, provenientes destas larvas, foram mantidos em gaiolas entomológicas e alimentados *ad libitum* com solução aquosa de açúcar a 10%. Para a maturação ovárica das fêmeas, foi fornecida, 2 a 3 vezes por semana, a possibilidade das fêmeas realizarem refeição de sangue a partir de *Mesocricetus auratus*, previamente anestesiados com uma injeção intraperitoneal de uma solução combinada de xilazina (Rompun® 2%, Bayer, Canadá) e quetamina (Imalgene® 1000, Merial, Portugal), com proporção adequada à espécie e tamanho do animal (Hedenqvist & Hellebrekers, 2003). Os ovos obtidos nas posturas foram posteriormente mergulhados em água, para obtenção de uma nova geração de adultos, processo que decorreu até à geração F2 em tinas de plástico e gaiolas devidamente identificadas.

3.3. Otimização da metodologia a aplicar no Paúl do Mar

Antes de se iniciar o estudo da auto-disseminação de PPF no Paúl do Mar foi elaborada a otimização da metodologia a utilizar. Todos os bioensaios foram executados nos laboratórios da DRADR entre os meses de Setembro e Dezembro de 2014.

3.3.1. Avaliação da eficácia das armadilhas GAT e BGs na área em estudo no Paúl do Mar e em Santa Luzia

A armadilha BGs (consultar figura 7 abaixo) foi especialmente desenvolvida para a monitorização dos mosquitos vetores da febre-amarela e dengue, nomeadamente *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*. Esta armadilha está direcionada para a captura de mosquitos que procurem realizar uma refeição de sangue. É um aparelho leve, de transporte fácil, que necessita de energia elétrica (12V) para funcionar, e pode ser utilizada no interior ou exterior das habitações. A armadilha tem um formato cilíndrico, constituída por material plástico branco, e é isolada no topo por uma gaze branca com um funil preto plástico ao centro que permite a entrada dos mosquitos. No seu interior contém uma ventoinha, o cabo com ligação ao exterior para o funcionamento da mesma, o saco de captura e uma pequena rede para facilitar a entrada e captura dos exemplares sem os danificar. Quando ligada, o ar entra na armadilha por sucção pela ventoinha e é

expelido num movimento de convecção através gaze branca no topo. As armadilhas BGs funcionaram com o atratante *BG-Lure* que mimetiza os odores corporais humanos. Estas armadilhas são consideradas ecológicas visto que não atraem insetos polinizadores, não emitem químicos e não necessitam de inseticidas (Biogents 2015a).



Figura 7: Armadilha BGs no pátio de uma casa no Paúl do Mar (fotografia da autora).

As armadilhas GAT (consultar figura 8 abaixo) são armadilhas passivas e de transporte fácil, direccionadas para a captura de fêmeas grávidas do género *Aedes*. Estas armadilhas são constituídas por um balde de plástico preto, no qual se encaixa uma câmara plástica transparente e um funil preto no topo para a entrada dos exemplares. No interior são colocadas água e duas redes redondas, uma de cor preta não impregnada com inseticida e uma de cor azul impregnada com inseticida. As redes impedem que os mosquitos que entram na armadilha consigam chegar à água e realizar a oviposição. A câmara transparente em conjunto com uma terceira rede de cor azul, esta também impregnada com inseticida e de forma retangular que é colocada à volta do funil preto, impedem a saída dos exemplares que entram na GAT. O formato e cores da armadilha foram desenhados no sentido de simularem criadouros de mosquitos do género *Aedes* atraindo-os (Biogents 2015b).



Figura 8: Armadilhas GAT colocadas em pátios de casas no Paúl do Mar (fotografias da autora)

As armadilhas BGs, ao invés das armadilhas GAT, já são utilizadas na ilha da Madeira como ferramenta de vigilância entomológica. Desta forma, foi decidido comparar a eficácia de ambas as armadilhas na captura de *Ae. aegypti* na área de estudo no Paúl do Mar e, também, em Santa Luzia onde as densidades do mosquito são as mais elevadas que se tem registado na ilha.

A avaliação das armadilhas no Paúl do Mar decorreu de 20/09/2014 a 30/09/2014, onde foram distribuídas numa área de 27138m², 7 armadilhas BGs e 38 armadilhas GAT (consultar a figura 9 abaixo). Relativamente a Santa Luzia, a avaliação decorreu de 21/10/2014 a 04/11/2014 numa área de 126,335m², na qual já se encontravam distribuídas 4 armadilhas BGs pertencentes ao Instituto de Administração da Saúde e Assuntos Sociais (IASAÚDE), e, por isso, apenas foram distribuídas 20 armadilhas GAT (consultar a figura 10 abaixo). Em ambos os locais, as armadilhas BGs funcionaram com atratante e em ciclos contínuos, e a colheita dos exemplares foi efetuada diariamente. Quanto às armadilhas GAT, foi introduzida no seu interior 2L de água desclorada e alfafa, que serviu de atratante de mosquitos, e as colheitas foram efetuadas em intervalos de 72h.

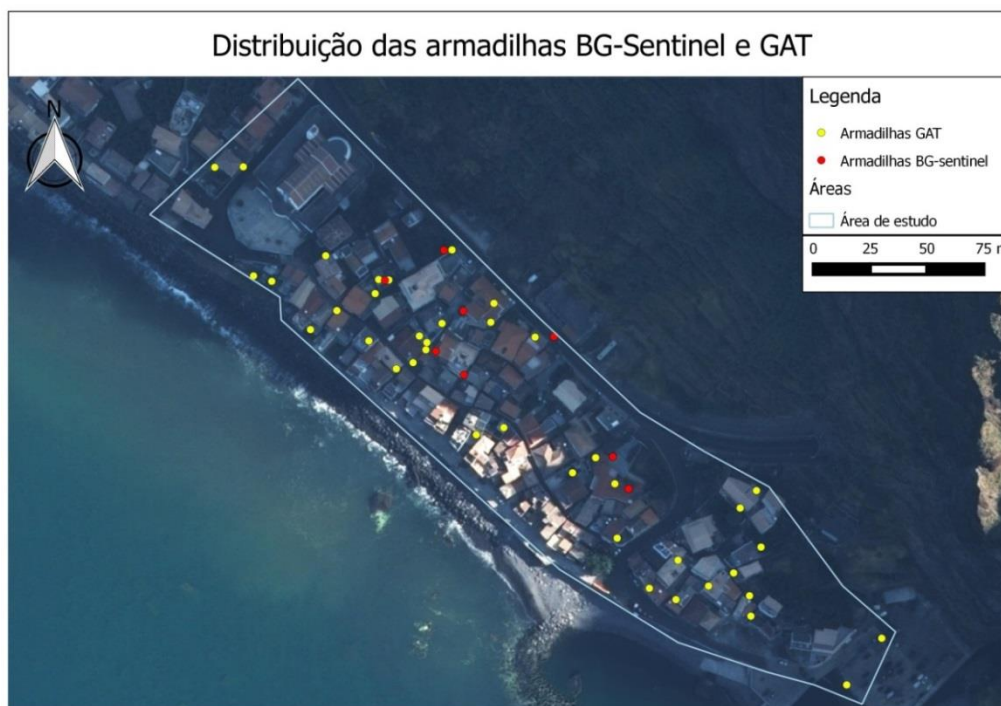


Figura 9: Distribuição das armadilhas BGs e GAT na área em estudo no Paúl do Mar (mapa elaborado em colaboração com o IASAUDE)

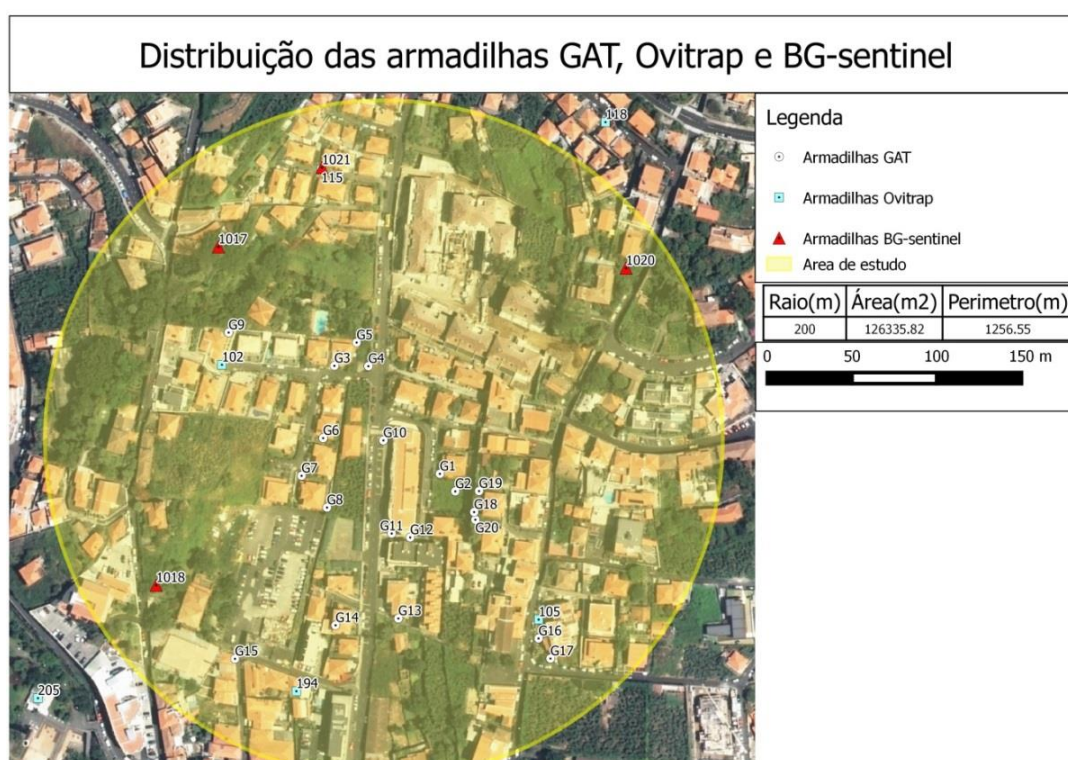


Figura 10: Distribuição das armadilhas GAT em Santa Luzia, Funchal, conjuntamente com armadilhas BGs e *ovitrap*s distribuídas pelas equipas da Unidade de Saúde Ambiental do IASAUDE (mapa elaborado em colaboração com o IASAUDE)

3.3.2. Testes diagnóstico da OMS de suscetibilidade a aduicidas

O conhecimento das resistências a inseticidas numa população vetora é crucial para que se possam implementar medidas e estratégias de controlo eficazes (WHO, 2013). A população de *Ae. aegypti* na Ilha da Madeira é resistente a inseticidas da classe dos piretróides e ao DDT. Visto que as armadilhas GAT contêm uma rede impregnada com um inseticida pireteróide, a alfa-cipermetrina, foram realizados testes de suscetibilidade a inseticidas recorrendo aos kits e testes padronizados da OMS, por forma a compreender se as populações PdM e Fx são resistentes (WHO, 2013).

Os inseticidas testados, nas concentrações designadas como diagnosticantes pela OMS (WHO, 2013), foram: permetrina, 0,75% (piretróide de classe I), ciflutrina, 0,15% (piretróide de classe II), bendiocarb, 0,1% (carbamato) e fenitrotiona, 1% (organofosforado). Visto que os testes OMS não possuem papéis impregnados com alfa-cipermetrina, foi testada, em alternativa, a suscetibilidade de ambas as populações à ciflutrina, que pertence à mesma classe de piretróides.

Os ensaios foram realizados de acordo com os protocolos padronizados pela OMS (WHO, 2013). Foram selecionadas para a exposição aos inseticidas fêmeas não alimentadas com 2 a 5 dias de vida, e utilizaram-se machos da mesma idade para os controlos. Desta forma, foram expostos a papéis impregnados com os inseticidas anteriormente referidos, grupos de 25 mosquitos, por forma a perfazer um mínimo de 100 fêmeas por inseticida testado. Verificou-se uma exceção às recomendações da OMS, visto que o número máximo recomendado de mosquitos por tubo nem sempre foi respeitado, sendo que o número mínimo de mosquitos ensaiados que se observou foi 20 e o máximo 26. O tempo de exposição das fêmeas a cada um dos inseticidas foi o recomendado pela OMS, ou seja, 1 hora, tendo sido registado o número de mosquitos tombados na base dos tubos de exposição aos 10, 15, 20, 30, 40, 50 e 60 minutos. Terminado o tempo de exposição, os mosquitos foram devolvidos ao tubo de repouso onde permaneceram durante 24h. Após 24h, os resultados foram analisados, e efetuaram-se os seguintes cálculos para a totalidade de fêmeas mortas expostas a um inseticida:

- 1) Calcula-se a percentagem de mortalidade para o tubo-controlo segundo a seguinte fórmula:

$$\frac{\text{nº de mosquitos mortos no tubo controlo}}{\text{nº de mosquitos ensaiados no tubo controlo}} \times 100$$

- 2) Se a percentagem de mortalidade no tubo-controlo for inferior a 5% então a percentagem de mortalidade das fêmeas expostas ao inseticida é calculada através da fórmula:

$$\frac{\text{Soma do nº de fêmeas mortas no tubo teste}}{\text{Soma do nº de fêmeas ensaiadas no tubo teste}} \times 100$$

- 3) Caso a percentagem de mortalidade no tubo-controlo variar entre 5-20%, o cálculo da mortalidade nos tubos-teste deverá ser corrigida de acordo com a fórmula de Abbott. A percentagem da mortalidade nos tubos-controlo e nos tubos-teste é calculada como foi referido, e, de seguida, o cálculo corrigido é efetuado segundo a fórmula:

$$\frac{\% \text{ mortalidade tubos teste} - \% \text{ mortalidade tubo controlo}}{100 - \% \text{ mortalidade tubo controlo}} \times 100$$

Se a percentagem de mortalidade nos tubos-controlo for superior a 20%, o ensaio deverá ser eliminado, não entrando para os cálculos acima referidos.

De acordo com as recomendações da OMS, a definição da existência de resistência aos inseticidas testados depende do valor da percentagem de mortalidade obtida para o conjunto dos tubos teste. Assim, se o valor variar entre:

- 98-100 % de mortalidade – considera-se que a população é suscetível;
- < 98 % de mortalidade – sugere a existência de resistência;
- 90-97 % de mortalidade – deve-se averiguar a presença de resistência através de testes dose-resposta;

- < 90 % de mortalidade a população em causa é considerada resistente desde que tenham sido testados um mínimo de 100 mosquitos para cada população.

3.3.3. Testes de cone da OMS para avaliação da eficácia das redes impregnadas com alfa-cipermetrina das armadilhas GAT

Para avaliar a eficácia das redes impregnadas com alfa-cipermetrina das armadilhas GAT, recorreu-se aos Testes de Cone segundo as recomendações da OMS para monitorizar a durabilidade de redes impregnadas com inseticida (WHO, 2011b). As populações de mosquitos testadas foram: Rockefeller, Paúl do Mar e Funchal.

Foram selecionadas aleatoriamente 5 redes impregnadas com inseticida das armadilhas GAT e fixadas por intermédio de pins em 5 placas de esferovite. Em cada uma das redes colocaram-se dois cones como é demonstrado na figura 11 abaixo.

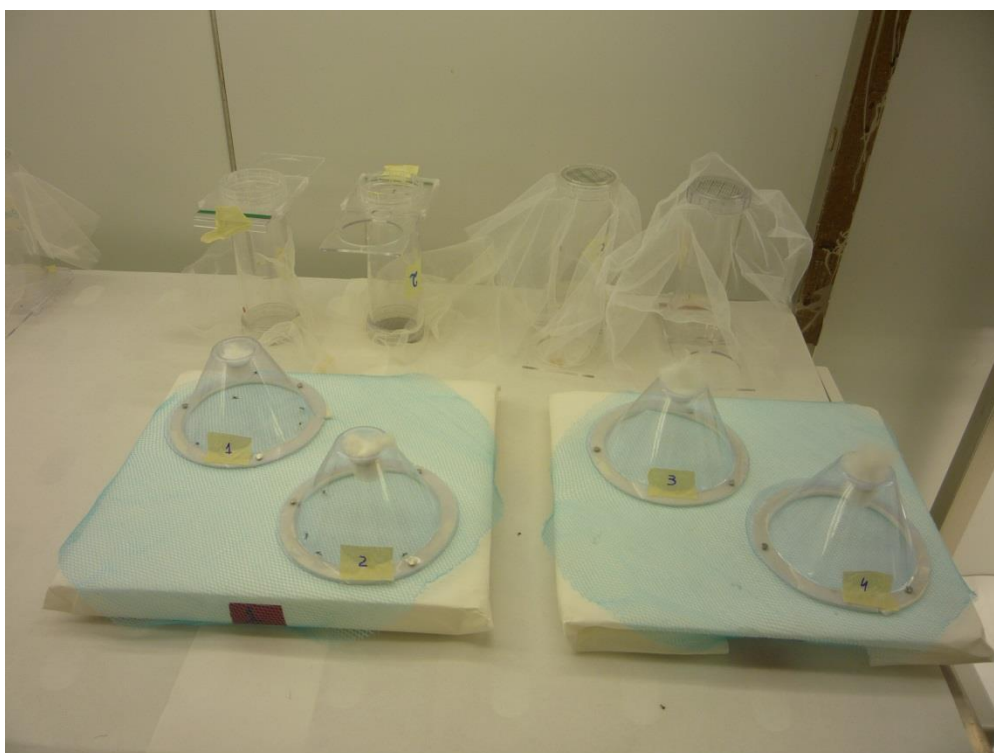


Figura 11: Testes de Cone realizados para as redes impregnadas com inseticida das armadilhas GAT

Introduziram-se grupos de 5 fêmeas não alimentadas com 2 a 5 dias de vida em cada um dos cones onde permaneceram durante 3 minutos. Após o tempo de exposição, cada grupo de fêmeas foi removido dos cones e colocado em tubos de repouso OMS, onde permaneceram durante 24h. O mesmo procedimento foi realizado para as fêmeas controlo, que foram expostas a uma rede não impregnada com inseticida. Após 24h a

taxa de mortalidade nos cones teste foi calculada de acordo com as fórmulas anteriormente referidas nos testes de diagnóstico de suscetibilidade a inseticidas.

De acordo com as recomendações da OMS, uma rede impregnada com inseticida é considerada eficaz se os valores de “knock-down” $\leq 95\%$, ou as taxas de mortalidade $\geq 80\%$, sendo que estes valores são estimados para o total de redes e cones testados.

3.3.4. Avaliação das armadilhas BGs como meio de disseminação de piriproxifeno

Na proposta inicial do estudo de auto-disseminação de PPF no Paúl do Mar, foi sugerido utilizar as armadilhas GAT como meio de disseminação de PPF. De acordo com os resultados obtidos, que serão apresentados mais adiante, foi decidido utilizar as armadilhas BGs ao invés das armadilhas GAT para disseminar PPF. Para garantir que as armadilhas BGs fossem eficazes, realizou-se um ensaio de pequena escala em condições de laboratório a fim de simular a metodologia a aplicar no Paúl do Mar. Desta forma, colocou-se uma armadilha BGs numa sala isolada ($\pm 9m^2$) à temperatura ambiente e fotoperíodo de 12h/12h claro/escuro, que funcionou em ciclos de 1h ligada/1h desligada. O saco de captura desta armadilha foi previamente pulverizado com pó-fluorescente. Os ciclos de funcionamento de 1h ligada/desligada foram conseguidos por intermédio de um relé programado para o efeito que foi conectado à armadilha. Foram selecionados no total 25 fêmeas não alimentadas e 25 machos, da população Fx, e libertados nessa mesma sala onde permaneceram durante 24h. Terminado o período de 24h, cada mosquito foi capturado individualmente por intermédio de aspiradores de boca. Este processo teve por objetivo prevenir que os mosquitos marcados com pó-fluorescente perdessem o pó no processo de captura, ou que o transferissem para mosquitos não marcados com o mesmo, mantendo, desta forma, a integridade dos resultados. Para a visualização da fluorescência, cada mosquito foi observado individualmente ao estéreomicroscópio sob a incidência de luz ultravioleta.

3.4. Estudo piloto de auto-disseminação de piriproxifeno no Paúl do Mar

O estudo de auto-disseminação compreendeu três fases: pré-tratamento (sem disseminação de PPF), tratamento (que corresponde à disseminação de PPF) e pós-tratamento (avaliação das densidades de mosquitos após a disseminação de PPF).

A estratégia utilizada neste estudo piloto visa explorar os comportamentos inatos dos mosquitos. Esta abordagem denominada de “auto-disseminação” está baseada na capacidade de os mosquitos transferirem PPF a partir de uma estação de disseminação para os seus criadouros no ato de oviposição ou repouso. Visto que PPF não tem efeitos letais ou repelentes na fase adulta, os comportamentos necessários para que ocorra a auto-disseminação de PPF não são afetados. O mosquito *Ae. aegypti*, durante o mesmo ciclo gonotrófico, realiza a oviposição em vários criadouros, que em conjunto com as reduzidas concentrações de atuação do PPF permitem uma cobertura abrangente deste análogo da HJ a partir de uma pequena área de disseminação (Caputo et al., 2012; Devine et al., 2009).

1) Primeira fase - Pré-tratamento

O estudo de auto-disseminação de PPF teve início com o pré-tratamento, em que não houve disseminação de PPF. Piriproxifeno atua nas fases imaturas dos insetos, inibindo a emergência dos adultos, logo, primeiramente, foi estudado o desenvolvimento normal de *Ae. aegypti* na área em estudo, ou seja, na ausência do piriproxifeno. Assim, no pré-tratamento obtiveram-se os dados que serviram de controlo deste estudo. É importante referir que os dados obtidos através da avaliação da eficácia das armadilhas BGs, efetuada no início deste trabalho serviram, também, para avaliar as densidades de adultos de *Ae. aegypti* na área em estudo antes da disseminação de PPF.

Para estudar o desenvolvimento das fases imaturas, que decorreu de 04/10/2014 a 09/10/14, foram distribuídos um total de 37 criadouros artificiais na área em estudo, cada um com 250 ml de água desclorada e 20 larvas no terceiro estado de desenvolvimento da população Fx, criadas em insectário. Em cada criadouro, foi colocado meio biscoito de gato para a alimentação das larvas. Os criadouros foram visitados em intervalos de 48h por forma a acompanhar o desenvolvimento das formas imaturas. As pupas foram colhidas e levadas para laboratório a fim de se observarem as emergências. Todas as larvas e pupas encontradas mortas nos criadouros foram também

removidas e registadas, assim como as posturas, quando presentes. À medida que a colheita dos imaturos terminava, os criadouros foram sendo removidos, e quando os imaturos de todos os criadouros foram colhidos, passou-se à fase seguinte.

2) Segunda fase – Tratamento

A fase de tratamento consistiu na disseminação de PPF na área em estudo e compreendeu duas rondas, denominadas de 1º tratamento e 2º tratamento. A disseminação de PPF decorreu por intermédio das mesmas armadilhas BGs utilizadas na avaliação da eficácia das mesmas, no decorrer da otimização da metodologia a aplicar neste estudo, que se mantiveram distribuídas nos mesmos locais desde então. As armadilhas BGs funcionaram em ciclos de 1h ligadas/ 1h desligadas, e os sacos de captura foram previamente pulverizados com uma formulação de 0,5G de PPF na concentração de 10% (Sumilarv 0,5G®, moído a partículas de 20-30 µm). A utilização das armadilhas BGs como meio de disseminação de PPF explora os comportamentos de alimentação de *Ae. aegypti*. Os mosquitos são atraídos para as armadilhas e sugados para o saco de captura, entram em contato com as partículas de PPF, e transportam-nas quando são libertados, após a armadilha se desligar.

Piriproxifeno atua em doses muito reduzidas na ordem das partes por trilião. Como não existem métodos capazes de medir a presença deste químico na água dos criadouros, a sua deteção ocorre por observação do desenvolvimento das fases imaturas, mais precisamente, através da inibição das emergências (Caputo et al., 2012; Devine et al., 2009).

O 1º tratamento decorreu de 09/10/14, que correspondeu ao último dia do pré tratamento, até 17/10/14; e o 2º tratamento de 20/10/2014 até 17/11/2014. O 2º tratamento deveria ter sido iniciado no último dia do 1º tratamento, no entanto as larvas não se encontravam ainda no 3º estágio de desenvolvimento e devido às más condições meteorológicas, o início do 2º tratamento teve de ser adiado para dia 20/10/2014. A metodologia aplicada em ambas as rondas da fase de tratamento foi a mesma do pré-tratamento, sendo que os criadouros artificiais foram colocados nos mesmos locais, com exceção de que no 2º tratamento foi adicionada 3ml de uma solução de alfafa nos criadouros artificiais ao invés de biscoitos de gato.

Por último, a disseminação de PPF pelas armadilhas BGs decorreu desde o início do 1º tratamento, no dia 09/10/14, até 26/10/2014, em que foram desligadas e os sacos de captura pulverizados com PPF removidos.

3) Terceira fase – pós-tratamento

Após a disseminação de PPF na área em estudo, foi avaliada a densidade de *Ae. aegypti* a fim de se averiguar se a disseminação de PPF na área em estudo teve algum impacto na abundância da população local de mosquitos.

As armadilhas BGs capturam mosquitos fêmeas e machos em quantidades similares e têm demonstrado ser eficazes tanto na avaliação rápida das densidades de *Ae. aegypti* como na sua monitorização de rotina (Williams et al., 2007; Williams, Long, Russell, & Scott, 2006). Desta forma, foram utilizadas as mesmas armadilhas que já se encontravam distribuídas no Paúl do Mar para avaliar as densidades de *Ae. aegypti* local após a disseminação de PPF. As armadilhas BGs foram novamente ligadas e funcionaram com atractante *BG-lure* em ciclos contínuos. Utilizaram-se sacos de captura novos, não conspurcados com PPF, e as colheitas dos exemplares decorreu diariamente de 12/11/14 até 21/11/14.

3.5. Bioensaio de transferência de piriproxifeno de machos adultos para fêmeas

As armadilhas BGs foram utilizadas como meio de disseminação de PPF no estudo de auto-disseminação no Paúl do Mar. Estas armadilhas capturam não só fêmeas, que procuram realizar uma refeição de sangue, como machos. Desta forma, foi realizado um bioensaio em condições de insectário que visa compreender se machos expostos ao PPF nas armadilhas BGs são capazes de o transferir para fêmeas não expostas, causando, posteriormente, impacto na fertilidade das mesmas.

O ensaio consistiu numa ronda com 4 réplicas e 1 controlo. Foram seleccionados um total de 75 machos da população Fx, do mesmo lote de pupas, com 3 a 4 dias de vida.

1) Exposição dos machos ao piriproxifeno

Cinco grupos de 15 machos foram divididos para copos de plástico individuais isolados com tule. Quatro dos 5 copos contendo os machos foram pulverizados com a

mesma formulação de PPF (Sumilarv 0,5G[®], moído a partículas de 20-30 µm) utilizada no estudo de auto-disseminação no Paúl do Mar. O copo que não foi pulverizado corresponde aos machos do grupo controlo. Os mosquitos permaneceram nos copos durante 1h, como está ilustrado na figura 12 abaixo, por forma a simular o contato com o PPF nos sacos de captura das armadilhas BGs.



Figura 12: Exposição dos machos *Ae. aegypti* à formulação de piriproxifeno (fotografia da autora).

2) Remoção dos machos dos copos

Terminada a hora de exposição, os copos contendo os machos foram arrefecidos numa caixa de esferovite com placas de gelo, durante 30 segundos, por forma a provocar o “knock-down” dos mosquitos. De seguida, cada grupo de machos foi gentilmente removido dos copos, por intermédio de uma pinça, para placas de petri individuais. Todo o processo decorreu primeiramente e de igual forma para os machos do grupo controlo por forma a evitar contaminações.

3) Contato dos machos expostos ao PPF com fêmeas não expostas

Cinco grupos de 30 fêmeas do mesmo lote de pupas, não alimentadas e com 3 a 4 dias de vida da população Fx, foram divididos por 5 gaiolas: 1 gaiola controlo e 4 gaiolas teste. As caixas de petri contendo os machos tombados foram colocadas dentro das gaiolas correspondentes, controlo e testes. De seguida, os mosquitos foram observados durante 1h para garantir que os machos tombados recuperavam do processo de arrefecimento.

Os mosquitos foram deixados a copular durante 24h e alimentados *ad libitum* com solução aquosa de açúcar a 10%. Após o período de 24h, os machos foram removidos das gaiolas, permanecendo unicamente as fêmeas.

4) Avaliação da fertilidade

Após remoção dos machos, foi fornecida às fêmeas duas refeições de sangue de *Mesocricetus auratus* com 48h de intervalo. Após a segunda refeição de sangue, foi colocado 1 copo em cada uma das gaiolas contendo 150ml de água desclorada e papel de filtro para a oviposição. As fêmeas mantiveram-se alimentadas *ad libitum* com solução aquosa de açúcar a 10%, e a contagem dos ovos e substituição dos papéis de filtro decorreu diariamente. Após 48h de secagem, os papéis de filtro contendo ovos foram mergulhados em tinas de plástico com água desclorada a fim de se observarem as eclosões. Os papéis de filtro ficaram mergulhados nas tinas por um período de 5 dias, após o qual foram removidos. As larvas eclodidas foram colhidas e contadas durante um período de 9 dias após a primeira emergência de ovos na água. A oviposição decorreu durante um período de 10 dias, após o qual as fêmeas foram mortas e preservadas para subsequente disseção.

3.6. Análise estatística

As análises estatísticas foram efetuadas recorrendo ao *software* GraphPad Prism (versão 5,03 GraphPad Prism®). Foi estabelecido, para todas as análises, um nível de significância de 0,05 (P), e rejeitaram-se as hipóteses nulas quando $P < 0,05$.

A elaboração dos mapas foi realizada em colaboração com o IASAUDE recorrendo ao programa informático QGIS (QGIS® versão 2.8).

4. RESULTADOS

4.1. Otimização da metodologia a aplicar no Paúl do Mar

4.1.1. Avaliação da eficácia das armadilhas GAT e BGs na área em estudo no Paúl do Mar e em Santa Luzia

A avaliação das armadilhas GAT e BGs em ambos os locais permitiu comparar a eficácia de ambas as armadilhas na captura de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762). Os resultados obtidos estão apresentados nas tabelas 1 e 2, e figura 13 adiante.

Tabela 1: Número médio de exemplares *Ae. aegypti* (fêmeas+machos) capturados por armadilha, por dia, no Paúl do Mar e em Santa Luzia.

Armadilha	Local	Média Fêmeas +machos /armadilha/ dia	Desvio Padrão	Média Fêmeas +machos /armadilha/ dia	Desvio Padrão	K. S.* P-value	Teste-t P-value
GAT	Paúl do Mar	0.04	0.02	0.1283	0.1	0.2488 P=0.200	5.68 P=0.0002
	Santa Luzia	0.2167	0.05				
BG	Paúl do Mar	3.5	1.19	4.453	1.86	0.2179 P=0.200	
	Santa Luzia	5.4	2.134				

*Teste Kolmogorov-Smirnov para a normalidade

Tabela 2: Número médio de fêmeas *Ae. aegypti* capturadas por armadilha, por dia, no Paúl do Mar e em Santa Luzia

Armadilha	Local	Média fêmeas /armadilha/ dia	Desvio Padrão	Média fêmeas /armadilha/ dia	Desvio Padrão	K. S.* P-value	Teste-t P-value
GAT	Paúl do Mar	0.037	0.015	0.13	0.1	0.2710 P=0.200	12.0 P<0.0001
	Santa Luzia	0.22	0.05				
BG	Paúl do Mar	1.04	0.17	1.12	0.17	0.1713 P=0.200	
	Santa Luzia	1.2	0.17				

*Teste de Kolmogorov-Smirnov para a normalidade

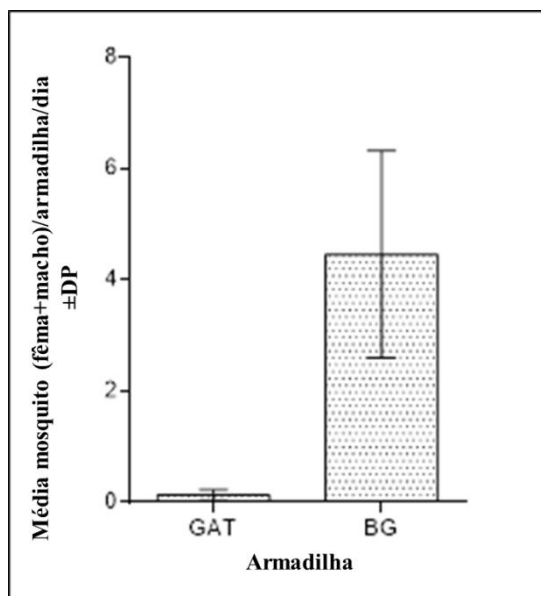


Figura 13.a

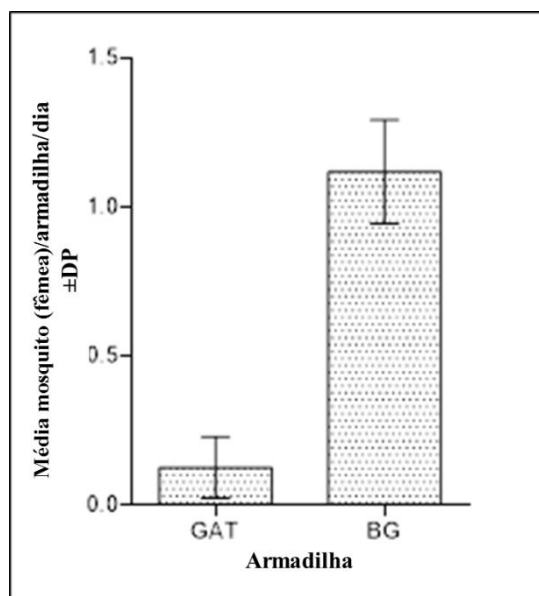


Figura 13.b

Figura 13: Capturas de *Ae. aegypti*(fêmeas+machos)(figura 13.a) e capturas de *Ae. aegypti* fêmeas (figura 13.b) por armadilha, por dia, no Paúl do Mar e em Santa Luzia

Ao comparar as capturas de *Ae. aegypti* por ambas as armadilhas, verifica-se que as armadilhas BG foram mais eficazes do que as armadilhas GAT.

Quanto às capturas pelas armadilhas GAT, de acordo com os resultados que se podem observar na tabela 3 que se segue, verificou-se que houve diferenças significativas na captura de *Ae. aegypti* em ambos os locais.

Tabela 3: Comparação das capturas de *Ae. aegypti* pelas GAT entre o Paúl do Mar e Santa Luzia

GAT	Teste do Qui-quadrado	
	X^2 *	P
Paúl do Mar vs Sta. Luzia (Fêmeas+machos)	21.497	< 0.0001
Paúl do Mar vs Sta. Luzia (Fêmeas)	23.52	<0,0001

*teste do Qui-quadrado com a correção de Yates

4.1.2. Testes de suscetibilidade a adulticidas

Os resultados obtidos pelos testes de suscetibilidade a inseticidas da OMS para as populações do Paúl do Mar (PdM) e Funchal (Fx) encontram-se descritos nas tabelas seguintes.

Tabela 4: Resultados dos testes diagnóstico OMS de suscetibilidade das populações Paúl do Mar (PdM) e Funchal (Fx) à permetrina

População		Permetrina 0,75%		Controlo	
		Mortos	Sobreviventes	Mortos	Sobreviventes
PdM	Réplica 1	9	14	0	20
	Réplica 2	5	18		
	Réplica 3	3	22		
	Réplica 4	7	16		
	Réplica 5	6	19		
	Total	30	89	0	20
	% Mortalidade	25%		0%	
Fx	Réplica 1	2	24	0	25
	Réplica 2	5	20		
	Réplica 3	3	21		
	Réplica 4	7	16		
	Réplica 5	4	22		
	Total	21	103	0	25
	% Mortalidade	17%		0%	

Tabela 5: Resultados dos testes de diagnóstico OMS de suscetibilidade das populações Paúl do Mar (PdM) e Funchal (Fx) à ciflutrina

População		Ciflutrina 0,15%		Controlo	
		Mortos	Sobreviventes	Mortos	Sobreviventes
PdM	Réplica 1	23	2	2	21
	Réplica 2	20	4		
	Réplica 3	21	4		
	Réplica 4	18	4		
	Réplica 5	19	5		
	Total	101	19	2	21
	% Mortalidade	84%		5%	
	% Mortalidade corrigida	83%		-	
Fx	Réplica 1	11	14	0	25
	Réplica 2	14	15		
	Réplica 3	15	9		
	Réplica 4	14	11		
	Total	21	49	0	21
	% Mortalidade	30%		0%	

Tabela 6: Resultados dos testes diagnóstico OMS de suscetibilidade das populações Paúl do Mar (PdM) e Funchal (Fx) ao *bendiocarb*

População		<i>Bendiocarb</i> 0,1%		Controlo	
		Mortos	Sobreviventes	Mortos	Sobreviventes
PdM	Réplica 1	10	15	0	25
	Réplica 2	11	15		
	Réplica 3	12	13		
	Réplica 4	16	9		
	Réplica 5	24	2		
	Total	73	54	0	25
	% Mortalidade	57%		0%	
Fx	Réplica 1	16	7	0	25
	Réplica 2	20	6		
	Réplica 3	19	6		
	Réplica 4	14	9		
	Total	69	28	0	25
	% Mortalidade	71%		0%	

Tabela 7: Resultados dos testes diagnóstico OMS de suscetibilidade das populações Paúl do Mar (PdM) e Funchal (Fx) à fenitrotiona

População		Fenitrotiona 1%		Controlo	
		Mortos	Sobreviventes	Mortos	Sobreviventes
PdM	Réplica 1	24	0	0	24
	Réplica 2	22	1		
	Réplica 3	25	0		
	Réplica 4	25	0		
	Réplica 5	24	1		
	Total	120	2	0	24
	% Mortalidade	98%		0%	
Fx	Réplica 1	22	2	0	25
	Réplica 2	25	1		
	Réplica 3	25	0		
	Réplica 4	20	0		
	Total	92	3	0	25
	% Mortalidade	97%		0%	

Segundo os resultados obtidos pelos testes de suscetibilidade aos inseticidas testados, ambas as populações PdM e Fx são resistentes aos piretróides permetrina e ciflutrina, assim como ao *bendiocarb*, visto que as taxas de mortalidade foram <90%. Relativamente à fenitrotiona, a população PdM é suscetível, dado que a taxa de mortalidade foi de 98%, e a população Fx sugere ser resistente, visto que a taxa de mortalidade foi de 97%. No entanto para confirmar a resistência da população Fx à fenitrotiona seria necessário efetuar exames genéticos para pesquisa da resistência.

4.1.3. Testes de Cone para avaliar a eficácia das redes impregnadas com alfa cipermetrina das armadilhas GAT

Os resultados obtidos pelos Testes de Cone às populações Rockefeller, Funchal e Paúl do Mar, encontram-se nas tabelas 8, 9 e 10, respetivamente, que se seguem.

Tabela 8: Resultados obtidos pelos Testes de Cone para a população Rockefeller (Rock)

Rock						
Rede	Mosquitos ensaiados/rede	Mortos/rede	% Tombados/rede	% Mortos/rede	% Total Tombados	% Mortalidade Total
Controlo	30	0	0 %	0 %	0 %	0 %
1	29	24	100 %	83 %	96 %	81 %
2	29	21	100 %	72 %		
3	29	22	86 %	76 %		
4	30	28	97 %	93 %		
5	30	24	97 %	80 %		

Tabela 9: Resultados obtidos pelos Testes de Cone para a população Funchal (Fx)

Fx						
Rede	Mosquitos ensaiados/rede	Mortos/rede	% Tombados/rede	% Mortos/rede	% Total Tombados	% Mortalidade Total
Controlo	30	0	0 %	0 %	0 %	0 %
1	27	5	52 %	19 %	49 %	30 %
2	28	9	39 %	32 %		
3	27	10	59 %	37 %		
4	30	10	50 %	33 %		
5	29	9	45 %	31 %		

Tabela 10: Resultados obtidos pelos Testes de Cone para a população Paúl do Mar (PdM)

PdM						
Rede	Mosquitos ensaiados/rede	Mortos/rede	% Tombados/rede	% Mortos/rede	% Total Tombados	% Mortalidade Total
Controlo	30	0	0 %	0 %	0 %	0 %
1	28	1	14 %	4 %	16 %	5 %
2	28	1	25 %	4 %		
3	30	1	17 %	3 %		
4	30	1	7 %	3 %		
5	30	3	17 %	10 %		

Pela análise dos resultados verifica-se que a mortalidade variou dentro das três populações testadas, sendo superior na população Rock, 81%, e inferior na população PdM, 5%. As populações resistentes Fx e PdM tiveram taxas de mortalidades de 30% e 5% respetivamente, valores que estão bastante abaixo do valor mínimo recomendado pela OMS para que as redes impregnadas com inseticida sejam consideradas eficazes ($\geq 80\%$). Para compreender se existem diferenças significativas nas mortalidades entre as três populações testadas, e entre as 5 redes impregnadas das GAT, foram realizados testes estatísticos de Kruskal-wallis, cujos resultados podem ser analisados nas tabelas 11 e 12 que se seguem.

Tabela 11: Comparação das taxas de mortalidade entre as três populações testadas: Rockefeller (Rock), Funchal (Fx) e Paúl do Mar (PdM)

População	K.S.* <i>P-value</i>	Teste Kruskal-Wallis	<i>P-value</i>
Rock	0,2717 P< 0,0001	63,36	< 0,0001
Fx	0,1730 P=0,0224		
PdM	0,4783 P< 0,0001		

*Teste de Kolmogorov-Smirnov para a normalidade

Tabela 12: Comparação das taxas de mortalidade entre as 5 redes impregnadas das GAT testadas

Rede	K.S.* <i>P-value</i>	Teste Kruskal-Wallis	<i>P-value</i>
1	0,2692 P=0,0013	0,5295	0,9706
2	0,2361 P=0,0091		
3	0,1985 P=0,0589		
4	0,2139 P=0,0288		
5	0,2026 P=0,0491		

*Teste de Kolmogorov-Smirnov para a normalidade

De acordo com a análise estatística, existem diferenças significativas entre as mortalidades das três populações testadas. Quanto às redes impregnadas, embora as taxas de mortalidade por rede tenham variado, o que sugere que as redes possam ter

impregnações de inseticidas diferentes, não houve diferenças significativas entre as 5 redes testadas.

4.1.4. Avaliação das armadilhas BGs como meio de disseminação de piriproxifeno

Dos 50 mosquitos libertados na sala isolada foram recapturados 42, dos quais 25 fêmeas e 17 machos. Após observação dos exemplares ao estereomicroscópio com exposição de luz ultravioleta, verificou-se que todos os mosquitos estavam marcados com o pó-fluorescente, como se pode observar na figura 14 que se segue.



Figura 14: Mosquitos recapturados (macho à esquerda e fêmea à direita) marcados com o pó-fluorescente (fotografias da autora).

4.2. Estudo piloto de auto-disseminação de piriproxifeno no Paúl do Mar

Os resultados obtidos nas fases de pré-tratamento e tratamento estão descritos na tabela 13, e encontram-se ilustrados nas figuras 15, 16 e 17 que se seguem.

Tabela 13: Resultados obtidos nas fases de pré-tratamento e tratamento

	Total de larvas colocadas nos criadouros artificiais	Imaturos Mortos	Adultos Emergidos	% Mortalidade
Pré-tratamento	608	25	583	4 %
1º Tratamento	630	140	490	22 %
2º Tratamento	401	122	279	30 %



Figura 15: Taxas de mortalidade obtidas nos criadouros artificiais na fase de pré-tratamento. Nota: as linhas representam uma interpolação entre as taxas de mortalidade registadas nos criadouros artificiais (mapa elaborado em colaboração com o IASAUDE).

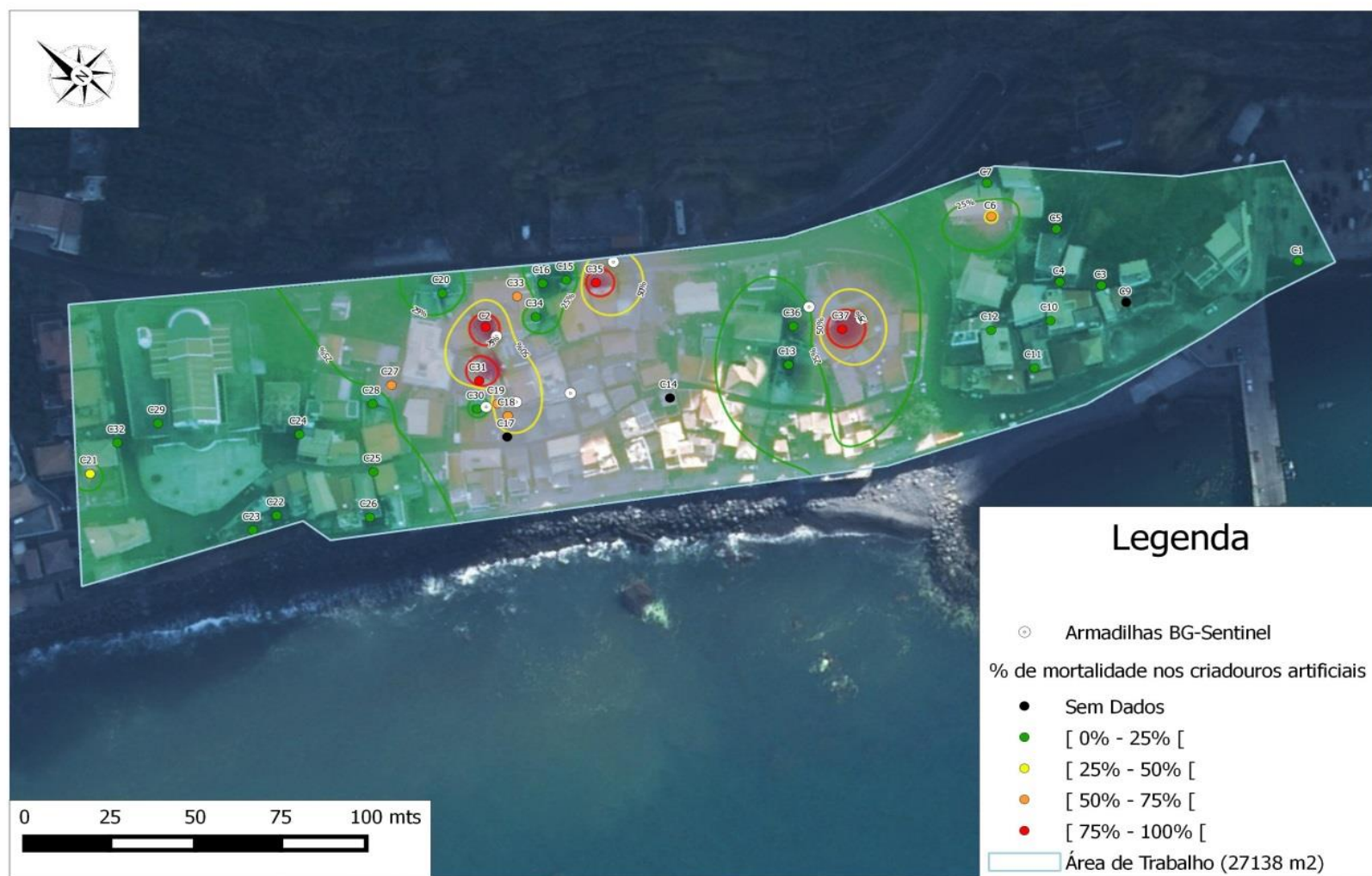


Figura 16: Taxas de mortalidade obtidas nos criadouros artificiais no 1º tratamento. Nota: as linhas representam uma interpolação entre as taxas de mortalidade registadas nos criadouros artificiais (mapa elaborado em colaboração com o IASAUDE)

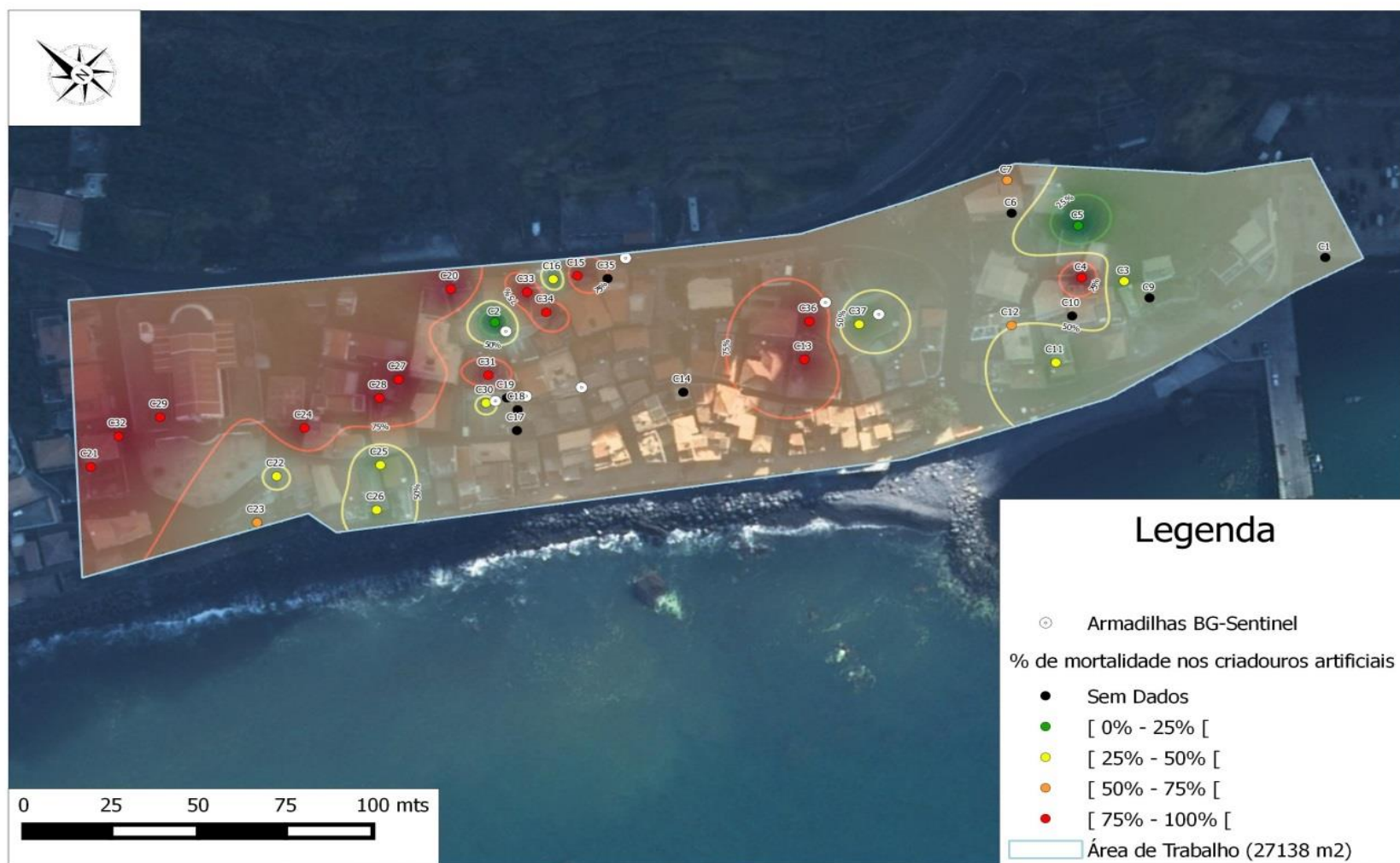


Figura 17: Taxas de mortalidade obtidas nos criadouros artificiais no 2º tratamento. Nota: as linhas representam uma interpolação entre as taxas de mortalidade registradas nos criadouros artificiais (mapa elaborado em colaboração com o IASAUDE).

Na fase de pré-tratamento, a taxa de mortalidade foi de 4%. Quando foi introduzida a disseminação de PPF na área em estudo, as taxas de mortalidade aumentaram para 22%, no 1º tratamento, e 30%, no 2º tratamento. Por observação das figuras 15 e 16, verifica-se que no 1º tratamento a mortalidade das formas imaturos ocorreu maioritariamente nos criadouros artificiais próximos das estações de disseminação, enquanto que no 2º tratamento a mortalidade dos imaturos ocorreu não só nos criadouros artificiais próximos das estações de disseminação, como noutros mais distantes.

A duração do período de colheita dos imaturos, que corresponde ao número de dias entre a colocação dos criadouros artificiais com as 20 larvas no 3º estágio de desenvolvimento e a colheita da última pupa, diferiu entre as fases de pré-tratamento e tratamento. O período de colheita do pré-tratamento decorreu durante 6 dias, enquanto que na fase de tratamento, esse período decorreu por 9 dias, no 1º tratamento, e 29 dias no 2º tratamento.

Para compreender se houve diferenças nas taxas de mortalidade nos criadouros artificiais com a disseminação de PPF, compararam-se os resultados obtidos entre as fases de pré-tratamento e tratamento, que estão apresentados na tabela 14 que se segue.

Tabela 14: Teste estatístico do Qui-quadrado para comparar os resultados referentes à taxa de mortalidade obtida nas fases de pré-tratamento e tratamento.

	Teste do Qui-quadrado	
	X^2 *	<i>P-value</i>
Pré-tratamento e 1º Tratamento	86.288	< 0.0001
Pré-tratamento e 2º Tratamento	132.3	< 0,0001
1º Tratamento e 2º Tratamento	8.269	0,004

*Teste do Qui-quadrado com a correção de Yates

Verifica-se que houve diferenças bastante significativas nas taxas de mortalidade nos criadouros artificiais entre a primeira fase (pré-tratamento) e a segunda fase

(tratamento), para ambas as rondas de 1º tratamento e 2º tratamento, e diferenças significativas entre as duas rondas da fase de tratamento.

A avaliação da abundância de mosquitos após a disseminação de PPF decorreu no término da segunda ronda da fase de tratamento, 2º tratamento. Os resultados obtidos pelas capturas na terceira fase e a sua comparação com as capturas obtidas antes de se iniciar o estudo de disseminação de PPF estão descritos nas tabelas 15 e 16 que se seguem.

Tabela 15: Resultados das capturas de *Ae. aegypti* pelas armadilhas BGs antes e após a disseminação de PPF

	Número médio machos+fêmeas/BGs/dia	D.P*	K.S.** P-value	Número médio fêmeas/BGs/dia	D.P*	K.S.** P-value
Pré-tratamento	3.289	1.106	0.182 P = 0.200	1.094	0.473	0.189 P = 0.200
Pós-tratamento	1.814	1.128	0.1785 P = 0.200	0.9268	0.593	0.263 P = 0.049

*DP – desvio padrão; **K.S. – Teste de Kolmogorov-Smirnov para a normalidade

Tabela 16: Teste de Mann-Whitney para comparação das capturas de *Ae. aegypti* antes e após a disseminação de PPF

BGs pré-tratamento vs BG pós-tratamento	Teste de Mann-Whitney (U) / Teste <i>t</i> (t)	P-value
Machos + Fêmeas	t = 2.951	0.0086
Fêmeas	U = 40.50	0.4933

De acordo com os resultados obtidos, apenas houve diferenças significativas relativamente ao número total de mosquitos *Ae. aegypti* capturados em ambos os períodos, mas não quanto ao número de fêmeas.

Visto que não existem diferenças entre o número de fêmeas capturadas antes e após a disseminação de PPF, compararam-se as capturas pelas armadilhas BGs distribuídas no Funchal nos dias correspondentes às capturas no Paúl do Mar. Os resultados estão apresentados nas tabelas seguintes.

Tabela 17: Teste *t* para comparar as capturas de *Ae. aegypti* pelas armadilhas BGs no Funchal, antes e após a disseminação de PPF no Paúl do Mar

Capturas <i>Ae. aegypti</i> Machos + Fêmeas	K.S.* <i>P-value</i>	Teste <i>t</i> (t)	<i>P-value</i>
Funchal pré-tratamento	0,2319 P=0,2000	t=2,480	0,0326
Funchal pós-tratamento	0,1737 P=0,2000		

*Teste de Kolmogorov-Smirnov para a normalidade

Tabela 18: Teste *t* para comparar as capturas de fêmeas *Ae. aegypti* pelas armadilhas BGs no Funchal, antes e após a disseminação de PPF no Paúl do Mar

Capturas <i>Ae. aegypti</i> Fêmeas	K.S.* <i>P-value</i>	Teste <i>t</i> (t)	<i>P-value</i>
Funchal pré-tratamento	0,2520 P=0,2000	t=0,5191	0,6150
Funchal pós-tratamento	0,1270 P=0,2000		

*Teste de Kolmogorov-Smirnov para a normalidade

Tabela 19: Teste *t* para comparar as capturas de *Ae. aegypti* entre o Paúl do Mar e o Funchal antes da disseminação de PPF

Capturas <i>Ae. aegypti</i> Machos + Fêmeas	K.S.* <i>P-value</i>	Teste <i>t</i> (t)	<i>P-value</i>
Paúl do Mar pré-tratamento	0,3260 P=0,0886	t=0,6603	0,4563
Funchal pré-tratamento	0,2319 P=0,2000		

*Teste de Kolmogorov-smirnov para a normalidade

Tabela 20: Teste *t* para comparar as capturas de fêmeas *Ae. aegypti* entre o Paúl do Mar e o Funchal antes da disseminação de PPF

Capturas <i>Ae. aegypti</i> Fêmeas	K.S.* <i>P-value</i>	Teste <i>t</i> (t)	<i>P-value</i>
Paúl do Mar pré-tratamento	0,3181 P=0,1093	t=0,2149	0,8352
Funchal pré-tratamento	0,2520 P=0,2000		

*Teste de Kolmogorov-Smirnov para a normalidade

Tabela 21: Teste *t* para comparar as capturas de *Ae. aegypti* entre o Paúl do Mar e o Funchal após a disseminação de PPF

Capturas <i>Ae. aegypti</i> Machos + Fêmeas	K.S.* <i>P-value</i>	Teste <i>t</i> (t)	<i>P-value</i>
Paúl do Mar pós-tratamento	0,2150 P=0,2000	t=0,4138	0,6863
Funchal pós-tratamento	0,1737 P=0,2000		

*Teste de Kolmogorov-Smirnov para a normalidade

Tabela 22: Teste de Mann Whitney para comparar as capturas de fêmeas *Ae. aegypti* entre o Paúl do Mar e o Funchal após a disseminação de PPF

Capturas <i>Ae. aegypti</i> Fêmeas	K.S.* <i>P-value</i>	Teste de Mann-Whitney (U)	<i>P-value</i>
Paúl do Mar pós-tratamento	0,3086 P=0,0427	U=18,50	0,4755
Funchal pós-tratamento	0,1270 P=0,2000		

*Teste de Kolmogorov-Smirnov para a normalidade

Pela análise dos resultados das capturas no Funchal, tal como no Paúl do Mar, apenas houve diferenças significativas relativamente ao total de capturas de *Ae. aegypti*, e não quanto às capturas de fêmeas. Além disso, também não houve diferenças quando

se compararam as capturas totais de *Ae. aegypti* e as capturas de fêmeas entre o Paúl do Mar e o Funchal antes (pré-tratamento) e após (pós-tratamento) a disseminação de PPF.

4.3. Bioensaio de transferência de piriproxifeno de machos adultos para fêmeas

Os resultados obtidos relativamente à produção de ovos, que inclui os ovos postos e retidos, pelas fêmeas do bioensaio de transferência de PPF encontram-se descritos na tabela 23 que se segue.

Tabela 23: Número de ovos postos e retidos pelas fêmeas que copularam com os machos expostos e não expostos (grupo controlo) ao PPF

Grupo de fêmeas	Nº de fêmeas	Produção total de ovos*	Número total de ovos postos	% ovos postos	Ovos postos/fêmea	Ovos retidos/fêmea	Produção de ovos/fêmea
Controlo	29	1181	713	60%	24	16	41
Teste 1	29	1712	861	50%	30	29	59
Teste 2	29	1068	956	90%	33	4	37
Teste 3	22	1382	660	48%	30	32	63
Teste 4	25	1522	911	60%	36	24	61

*Somatório dos ovos postos e retidos por grupo de fêmeas

Segundo os resultados, com exceção do grupo teste 2, as fêmeas que copularam com os machos expostos ao PPF produziram mais ovos que as fêmeas do grupo controlo. Verificou-se que a produção total de ovos nos grupos de fêmeas teste foi superior, assim como o número de ovos postos e retidos por fêmea. Para comparar o número médio de ovos postos em cada grupo de fêmeas teste com o grupo de fêmeas controlo recorreu-se ao teste estatístico de Kruskal-Wallis. O número de ovos retidos pelas fêmeas dos grupos teste e do grupo controlo também foi comparado através do teste estatístico do Qui-quadrado. Os resultados obtidos encontram-se nas tabelas 24 e 25 que se seguem.

Tabela 24: Comparação do número médio de ovos postos/fêmea entre as fêmeas dos grupos teste e as fêmeas do grupo controle

Grupo de fêmeas	K.S.* <i>P-value</i>	Teste de Kruskal-Wallis	<i>P-value</i>
Controle	0,2427 P=0,0979	3,767	0,5834
Teste 1	0,3454 P=0,0013		
Teste 2	0,3531 P=0,0009		
Teste 3	0,2687 P=0,0393		
Teste 4	0,3109 P=0,0069		

*Teste de Kolmogorov-Smirnov para a normalidade

Tabela 25: Comparação entre o número de ovos retidos pelas fêmeas dos grupos teste e pelas fêmeas do grupo controle

	Teste do Qui-quadrado	
	X^2 *	<i>P-value</i>
Controle vs Teste 1	0.191	0.662
Controle vs Teste 2	3.861	0.049
Controle vs Teste 3	0.292	0.589
Controle vs Teste 4	0.029	0,864

*Teste do Qui-quadrado com a correção de Yates

De acordo com os resultados obtidos não houve diferenças significativas entre o número médio de ovos postos por fêmea dos grupos teste e do grupo controle. Quanto ao número de ovos retidos, apenas se verificaram diferenças significativas no número de ovos retidos pelas fêmeas do grupo teste 2, visto que tiveram muito menos ovos retidos que as fêmeas do grupo controle.

Relativamente às eclosões, apenas foi possível observar a eclosão dos ovos postos nos primeiros 5 dias após a refeição de sangue das fêmeas. As larvas eclodidas foram colhidas e contadas, e os resultados estão descritos na tabela 26 que se segue.

Tabela 26: Número de eclosões após 9 dias de emergência dos papéis de filtro contendo ovos

Grupo de fêmeas	Total de ovos postos em 5 dias	Total de larvas eclodidas	Total de ovos não eclodidos	% Larvas Eclodidas
Controlo	494	344	150	70%
Teste 1	661	459	202	69%
Teste 2	803	582	221	72%
Teste 3	398	174	224	44%
Teste 4	645	292	353	45%

Para comparar o número de larvas eclodidas entre o grupo controlo e os grupos teste recorreu-se ao teste do Qui-quadrado, cujos resultados se encontram na tabela 27 que se segue.

Tabela 27: Comparação entre o número de larvas eclodidas do grupo controlo e dos grupos teste.

	Teste do Qui-quadrado	
	χ^2	<i>P-value</i>
Controlo vs Teste 1	4580e-005	0,9946
Controlo vs Teste 2	1.075	0,2998
Controlo vs Teste 3	59.75	< 0,0001
Controlo vs Teste 4	66.36	< 0,0001

Apenas se verificaram diferenças significativas no número de eclosões em 2 dos 4 grupos teste, mais precisamente dos grupos teste 3 e 4, nos quais houve um menor número de larvas eclodidas que no grupo controlo.

5. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

O mosquito *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) foi identificado pela primeira vez na ilha da Madeira, na cidade do Funchal, em 2005 (Gonçalves et al., 2008). Desde a sua deteção, surgiu a preocupação das autoridades locais e nacionais relativamente à presença deste mosquito na Madeira, não só por ser comprovadamente vetor de arbovírus (Marquardt et al., 2005), como também por constituir um risco para a reintrodução desta espécie a partir da ilha para o território europeu devido ao elevado movimento de pessoas e bens (Almeida et al., 2007). Assim sendo, foi desenvolvido um programa de controlo e vigilância entomológica, que teve por objetivo reduzir a densidade populacional do mosquito e compreender a sua distribuição na RAM. Este programa incluiu várias medidas, desde a distribuição de armadilhas para a vigilância de *Ae. aegypti*, à aplicação de inseticidas, destruição e limpeza de recipientes passíveis de serem biótopos larvares desta espécie, além da implementação de campanhas de sensibilização e educação para a população em conjunto com a comunicação social (Melim, 2012).

No entanto, apesar das medidas implementadas, em 2012 ocorreu o primeiro surto de dengue na ilha da Madeira. O mosquito *Ae. aegypti* continua a abundar na ilha o que constitui uma ameaça constante para o surgimento de novos surtos de doenças causadas por arbovírus que são transmitidos por esta espécie.

A utilização de reguladores de crescimento de insetos, nomeadamente o PPF, é uma medida promissora para o controlo de doenças transmissíveis por vetores. Desta forma, o estudo piloto de auto-disseminação de PPF no Paúl do Mar visou explorar uma nova abordagem que, eventualmente, possa ser incluída como estratégia adicional no programa de controlo do mosquito *Ae. aegypti* na Madeira.

5.1. Otimização da metodologia a aplicar no Paúl do Mar

5.1.1. Avaliação da eficácia das armadilhas GAT e BGs na área em estudo no Paúl do Mar e em Santa Luzia

A otimização da metodologia a aplicar no Paúl do Mar teve por objetivo assegurar de que o estudo piloto de auto-disseminação de PPF decorresse da melhor forma possível. Inicialmente, foi proposto utilizar as armadilhas GAT como meio de

disseminação de PPF, no entanto, como já foi referido anteriormente, este tipo de armadilhas iriam ser utilizadas pela primeira vez na ilha da Madeira.

Os resultados obtidos revelaram que as armadilhas BGs são mais eficazes na captura de *Ae. aegypti* do que as armadilhas GAT, dado que capturaram não só um maior número de fêmeas, que são os adultos epidemiologicamente relevantes, assim como um maior número de machos. Estes resultados estão de acordo com outro estudo realizado por Ritchie et al (2014) na cidade de Cairns, Austrália, em que a comparação de ambas as armadilhas revelou que as armadilhas BGs capturam um maior número de fêmeas que as armadilhas GAT (Ritchie et al., 2014). A eficácia das armadilhas BGs na captura de exemplares *Ae. aegypti*, fêmeas e machos, assim como de outras espécies de mosquitos, foi também demonstrada por Kröckel et al (2006), num estudo realizado na cidade de Belo Horizonte no estado de Minas Gerais, Brasil (Krockel et al., 2006).

A discrepância entre as capturas de *Ae. aegypti* pelas armadilhas GAT no Paúl do Mar e em Sta. Luzia poderá ser devida à diferença das densidades de mosquitos em ambas as localidades. Ao consultar o número de ovos recolhidos das armadilhas *ovitrap*s (dados gratuitamente cedidos pelo IASAUDE) que se encontram distribuídas em ambos os locais, ilustrado na figura 18 mais abaixo, verifica-se de que houve um menor de ovos recolhidos por *ovitrap* no período correspondente à avaliação da eficácia das armadilhas no Paúl do Mar, que decorreu nas semanas 39 e 40, do que em Santa Luzia, cujo período de avaliação decorreu nas semanas 43 e 44. Assim, o número de ovos recolhidos em Santa Luzia sugere a existência de uma maior densidade de mosquitos neste local o que, por conseguinte, poderá justificar a maior eficiência das armadilhas GAT neste tipo de contexto entomológico, ou seja, em locais de maior densidade de mosquitos.

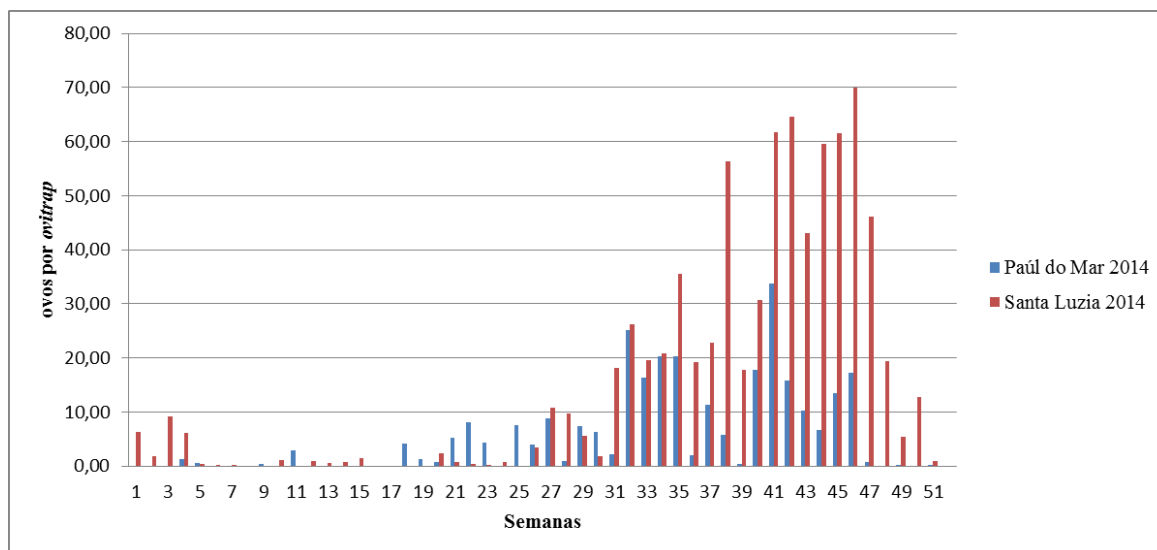


Figura 18: Número de ovos recolhidos por *ovitrap* por semana no Paúl do Mar e em Santa. Luzia em 2014

5.1.2. Testes de suscetibilidade a adulticidas

O controlo químico tem sido a estratégia mais utilizada no controlo e prevenção de doenças transmitidas por vetores. O uso extenso de inseticidas tem vindo a surgir preocupações relativamente ao aparecimento de resistências que condicionam a eficácia desta medida de controlo vetorial. Assim, é importante que seja elaborada uma monitorização constante das resistências existentes nas populações de mosquitos, por forma a que se tenha conhecimento dessas e para que se possam implementar medidas de controlo vetorial apropriadas. Relativamente ao mosquito *Ae. aegypti* já foram identificadas resistências às quatro classes de inseticidas, nomeadamente: piretróides, carbamatos, organoclorados e organofosforados (Ranson et al., 2010). Quanto à população de *Ae. aegypti* da ilha da Madeira, esta é resistente ao DDT, e aos piretróides permetrina e deltametrina (Seixas, 2012).

Os resultados obtidos pelos testes de suscetibilidade a inseticidas confirmaram a resistência das populações PdM e Fx à permetrina, além de serem também resistentes à ciflutrina, que são ambos piretróides. Verificou-se, também, que ambas as populações são resistentes ao *bendiocarb*, que é um carbamato. Quanto à fenitrotiona, que é um organofosforado, a população PdM é suscetível, no entanto, os resultados sugerem a possível resistência da população Fx. Desta forma pode-se concluir que as populações da ilha da Madeira são genericamente resistentes aos inseticidas mais comuns.

5.1.3. Testes de cone para avaliar a eficácia das redes impregnadas com alfa-cipermetrina das armadilhas GAT

As armadilhas GAT, ao contrário das armadilhas BGs, têm um baixo custo, são de fácil manutenção e transporte, além de que não necessitam de eletricidade para funcionar. São armadilhas passivas, direcionadas para a captura de fêmeas grávidas do género *Aedes*, que permitem uma captura fácil dos exemplares em campo, dado que ao entrarem em contato com a rede impregnada com inseticida morrem e ficam retidos dentro da armadilha. As características deste método são vantajosas para a monitorização da dengue em países em desenvolvimento cujos recursos são limitados (Eiras et al., 2014; Ritchie et al., 2014).

De acordo com os resultados anteriormente referidos neste trabalho, a população de *Ae. aegypti* da ilha da Madeira é resistente a inseticidas, além de que as armadilhas GAT demonstraram ser pouco eficazes em capturar esta espécie nas localidades onde foram testadas. Estas armadilhas têm por objetivo de serem letais (Eiras et al., 2014), e, desta forma, é importante garantir que as redes impregnadas com inseticida são eficazes para a população de mosquitos à qual são direcionadas. A durabilidade de uma rede impregnada com inseticida está dependente da manutenção da integridade da própria rede e da sua bioeficácia, ou atividade inseticida. Estes componentes são influenciados por fatores intrínsecos, que incluem os procedimentos de fabricação da rede, e extrínsecos, como o modo de utilização e o tipo de clima, que condicionam a eficácia das redes impregnadas assim como a sua deteriorização e desgaste (WHO, 2011b).

Através dos testes de cone verificou-se que as redes impregnadas com alfa-cipermetrina das armadilhas GAT não são igualmente eficazes para as populações PdM e Fx. Além disso, a mortalidade na população de referência Rock variou entre 72-93% nas 5 redes testadas. Estes resultados levam à conclusão de que estas redes não só são ineficazes devido à resistência a inseticidas piretróides das populações *Ae. aegypti* da ilha da Madeira, como também a impregnação do inseticida não é homogénea e a concentração do mesmo está abaixo da necessária para matar mosquitos suscetíveis.

5.1.4. Avaliação das armadilhas BGs como meio de disseminação de piriproxifeno

A diferença no número de capturas entre as armadilhas BGs e GAT, em conjunto com os resultados obtidos pelos testes de suscetibilidade a adulticidas da população de mosquitos local e dos testes de cone, levaram à decisão de se utilizar as armadilhas BGs como meio de disseminação de PPF no Paúl do Mar.

No desenho experimental original (Devine et al., 2009), a disseminação de PPF é conseguida através de estações de disseminação, que são estruturas artificiais com uma superfície contaminada com este químico, que simulam criadouros de mosquitos. Os mosquitos são atraídos para a estação de disseminação para realizar a oviposição ou repousar, e, após entrarem em contato com a superfície contaminada e na impossibilidade de porem ovos, vão procurar outros criadouros contaminando-os com as partículas de PPF que irão transportar nas patas e no corpo (Devine et al., 2009).

Neste trabalho, foi decidido utilizar as armadilhas BGs como estações de disseminação de PPF. Este tipo de armadilha visa atrair e capturar fêmeas que procuram realizar uma refeição de sangue (Maciel-de-freitas, Eiras, & Lourenço-de-oliveira, 2006). Visto que as armadilhas BGs estão direcionadas para uma fase do ciclo de vida dos mosquitos diferente das estações de disseminação habitualmente utilizadas, foi decidido testar a eficácia deste método alternativo antes de se prosseguir com a sua utilização no Paúl do Mar.

O ensaio realizado para testar as armadilhas BGs como estações de disseminação de PPF confirmou que estas poderiam ser um método eficaz visto que todos os mosquitos capturados no ensaio laboratorial estavam marcados com o pó-fluorescente. Desta forma, foi possível concluir que os mosquitos atraídos e capturados por estas armadilhas, tanto fêmeas como machos, transportam as partículas de pó-fluorescente após serem libertados. Em suma, os resultados sugerem que os mosquitos ao entrarem em contato com os sacos de captura pulverizados com PPF no Paúl do Mar são eventualmente capazes de o transferir para os seus criadouros após serem libertados pelas armadilhas BGs.

5.2. Estudo piloto de auto-disseminação de piriproxifeno no Paúl do Mar

A implementação do estudo piloto de auto-disseminação no Paúl do Mar foi possível devido à colaboração da população local que nos permitiu colocar as armadilhas e criadouros artificiais nas suas casas e visitá-los sempre que necessário. Na área em estudo existem inúmeras casas inacessíveis, por estarem abandonadas ou pertencerem a emigrantes, o que impediu uma distribuição homogénea dos criadouros artificiais. No decorrer das fases de pré-tratamento e tratamento, o número de imaturos colhidos nos criadouros artificiais não correspondeu ao total de imaturos inicialmente colocados. Durante o período de colheita, alguns criadouros artificiais foram encontrados virados, provavelmente pela população local, gatos ou vento, o que resultou na perda total ou parcial dos imaturos desses criadouros.

Ao comparar a mortalidade dos imaturos, verificou-se de que há diferenças significativas entre as fases de pré-tratamento e de tratamento. Na fase de pré-tratamento, como seria esperado, a mortalidade dos imaturos foi baixa, tendo aumentado significativamente após a disseminação de PPF. Estes resultados encontram-se de acordo com outro estudo de auto-disseminação de PPF realizado por Devine et al (2009) em Iquitos, Peru, em que a mortalidade dos imaturos *Ae. aegypti* obtida nos criadouros foi entre 49-98% em oposição à mortalidade nos criadouros controlo, 7-8%. Caputo et al (2012), num estudo direcionado para o controlo de *Ae. albopictus* em Roma, Itália, também vetor de dengue, obteve, em média, 20,9% de mortalidade das formas imaturas em contraste com 2,4% nos criadouros controlo (Caputo et al., 2012; Devine et al., 2009). Desta forma, a diferença das mortalidades nos criadouros artificiais distribuídos no Paúl do Mar, de 4% na fase de pré-tratamento para 22% e 30% na fase de tratamento, sugere que esses foram contaminados com PPF.

Os períodos de colheita também diferiram entre ambas as fases do estudo. Na fase de tratamento as larvas demoraram mais tempo a desenvolver para pupa do que na fase de pré-tratamento, resultando em períodos de colheita mais extensos. Piriproxifeno é um regulador do crescimento de insetos que mimetiza a HJ, sendo, por isso, um análogo da HJ. No ciclo de vida dos mosquitos há duas fases importantes que são sensíveis à ação dos análogos da HJ, nomeadamente o desenvolvimento embrionário e a metamorfose. Na fase de desenvolvimento ocorrem períodos críticos no início de cada

estádio larvar que são determinados por processos que envolvem a diferenciação tecidular e o crescimento. Fatores como a fome, baixas temperaturas e inibição do crescimento podem influenciar a duração destes períodos críticos, prolongando-os. Piriproxifeno vai interferir na metamorfose de imaturos expostos a este análogo da HJ, o que, por conseguinte, irá resultar num atraso e prolongamento do desenvolvimento dos estádos larvares até à fase de pupa (Sláma, 1971). Desta forma, é possível que o aumento do período de colheita na fase de tratamento seja devido à contaminação dos criadouros artificiais com PPF.

O período de colheita do 2º tratamento, além de mais extenso que o do pré-tratamento, foi bastante superior ao do 1º tratamento. No entanto, no 2º tratamento, não foi fornecida comida de gato às larvas, tendo sido apenas adicionada uma infusão de alfafa nos criadouros artificiais. A procura de um criadouro pelo mosquito *Ae. aegypti* é influenciada por estímulos visuais, olfativos, tácteis e quimio-tácteis, que permitem seleccionar o biótopo larvar mais adequado para a oviposição. A decomposição de matéria orgânica e a produção de determinados odores influenciam a escolha de criadouros por parte dos mosquitos. A utilização de infusões de plantas, como a infusão de alfafa, tem sido utilizada como attractante nas armadilhas de oviposição, como as *ovitraps*, para vigilância entomológica de mosquitos do género *Aedes* (Chadee et al., 1993; Ponnusamy et al., 2010). Polson et al (2002) testou a eficácia da adição de uma infusão de alfafa na concentração de 10% em armadilhas *ovitraps*, num estudo de vigilância entomológica de *Ae. aegypti* realizado em Phnom Phen, Camboja, e verificaram que as armadilhas com a infusão continham o dobro de ovos das que tinham apenas água (Polson et al., 2002). Outro estudo realizado por Reiter et al (1991) também demonstrou que na presença de infusão de alfafa não diluída (100%), e na concentração de 10%, o número de ovos nas *ovitraps* era superior às armadilhas que continham apenas água. A presença de fauna microbiota oriunda da infusão das plantas é uma fonte de nutrientes que serve de alimentação das larvas e potencia a sua sobrevivência, o que pode condicionar a escolha dos criadouros pelas fêmeas grávidas (Reiter et al., 1991).

Assim, a adição da infusão de alfafa teve como objetivo, não só fornecer alimento às larvas como funcionar de attractante para as fêmeas grávidas. No entanto, esta alteração veio introduzir um novo elemento metodológico ao desenho

experimental, e, conseqüentemente, é impossível concluir que o prolongamento do período de colheita dos imaturos assim como o aumento da mortalidade tenha ocorrido exclusivamente devido à ação de PPF. Todavia, foram identificadas posturas de *Ae. aegypti* em alguns dos criadouros artificiais, o que não se verificou na fase de pré-tratamento nem no 1º tratamento. Estas observações levam à conclusão de que pelo menos esses criadouros terão sido certamente visitados por mosquitos, o que será referência da ocorrência de auto-disseminação de PPF nesta segunda ronda de tratamento.

Em suma, os resultados sugerem que houve auto-disseminação de PPF no Paúl do Mar, no entanto, em estudos futuros, a metodologia não deve ser modificada para que não surjam dúvidas na análise e interpretação dos resultados. Deverá ser sempre fornecida comida às larvas por forma a garantir que estas não morrem de fome, além da adição de um atratante, como, por exemplo, a infusão de alfafa, cujo odor aparenta potenciar a atração desta espécie para os criadouros artificiais.

No 1º tratamento, a mortalidade das formas imaturas ocorreu principalmente nos criadouros artificiais que estavam distribuídos próximos das estações de disseminação de PPF. Num estudo de dispersão de *Ae. aegypti* numa zona urbana em Buenos Aires, Argentina, realizado por Bergero *et al* (2013), foi observado que estes mosquitos têm a tendência de se manterem próximos do seu local de emergência, dado que a distância máxima de dispersão registada foi 40 metros. As preferências hemáticas de *Ae. aegypti* são essencialmente antropofílicas, logo a presença de humanos condiciona a sua distribuição e dispersão. Esta espécie tem hábitos de oviposição no exterior das habitações, preferencialmente em locais onde existe abrigo, o que, em conjunto com a presença humana, faz com que os mosquitos não se dispersem muito além do seu local de emergência (Bergero *et al.*, 2013). Os criadouros artificiais distribuídos no Paúl do Mar estavam colocados no exterior das habitações, em pátios ou jardins, que contêm vegetação diversa e inúmeros vasos com plantas, além da presença constante de humanos. Estas características reúnem as condições necessárias para o desenvolvimento do mosquito *Ae. aegypti* que tem acesso a criadouros, alimento e abrigo, não necessitado de se dispersar muito. Desta forma, estes fatores podem justificar que os criadouros artificiais mais afetados no 1º tratamento tenham sido aqueles próximos das estações de disseminação.

No 2º tratamento, ao contrário do 1º tratamento, verificou-se uma maior dispersão da mortalidade, que abrangeu não só os criadouros artificiais que se encontravam próximos das estações de disseminação como outros mais distantes. A máxima distância entre um criadouro artificial e uma estação de disseminação na área em estudo foi de, aproximadamente, 129 metros. Estudos de dispersão com libertação e captura de exemplares *Ae. aegypti* realizados por Maciel-de-Freitas e Lourenço-de-Oliveira (2009) e David et al (2009) no Rio de Janeiro, Brasil, registaram que as fêmeas se dispersaram até 200 e 260 metros da estação de libertação, respectivamente. Assim, é possível que os criadouros mais distantes tenham sido efetivamente contaminados com PPF (David, Lourenço-de-oliveira, & Freitas, 2009; Maciel-de-freitas & Lourenço-de-oliveira, 2009). A auto-disseminação de PPF deverá ter contaminado não só os criadouros artificiais que foram distribuídos no decorrer do estudo, como criadouros naturais estáveis o que poderá ter resultado num efeito cumulativo deste larvicida, potenciando o seu efeito.

A mortalidade no 2º tratamento foi mais acentuada nos criadouros artificiais a norte da área em estudo, onde por sua vez há um maior número de casas habitadas. Uma maior concentração de casas habitadas e movimento de humanos pode influenciar a dispersão e densidade dos mosquitos naquela zona, assim como a proximidade dos criadouros artificiais a um maior número de estações de disseminação. Além disso, a própria distribuição dos criadouros artificiais poderá ter tido influência nas diferenças de mortalidades entre os criadouros. Devine et al (2009) no estudo realizado em Iquitos, Peru, obteve mortalidades diferentes nos criadouros artificiais distribuídos nos dois locais teste, nomeadamente 98% no local A, que tinha mais sombra e vegetação, e 59% no local B. O local A por ser mais abrigado poderá ter ser mais propício para uma maior abundância de *Ae. aegypti*, que terá levado a uma maior frequência de visitas pelos mosquitos aos criadouros artificiais e potenciado o número de eventos de contaminação (Devine et al., 2009). A influência do tipo de ecologia e distribuição dos criadouros artificiais na mortalidade das formas imaturas foi também notificada por Caputo et al (2012), com *Ae. albopictus*, que obteve mortalidade média superior no local teste 1 do que no local teste 2. O local teste 1 consistia num corredor subterrâneo de criptas num cemitério, de ecologia homogénea, enquanto que o local teste 2 era um jardim fechado, próximo do cemitério, de ecologia bastante heterogénea e de maior área. No local teste

2 a maioria da mortalidade das formas imaturas foi apenas observada em 50% dos criadouros artificiais, enquanto que no local teste 1 foi obtida 40-100% de mortalidade em todos os criadouros artificiais. Os criadouros distribuídos no local teste 1 podem ter sido igualmente atrativos para os mosquitos, enquanto que a heterogenicidade e maior área do local teste 2 podem ter condicionado a preferência das fêmeas de *Ae. albopictus* por uns criadouros e não outros (Caputo et al., 2012).

Desta forma, a distribuição dos criadouros artificiais no Paúl do Mar poderá ter condicionado o número de visitas pelos mosquitos. A diferença de mortalidades entre os criadouros artificiais poderá ter sido influenciada pelos locais onde estavam colocados, sendo que uns podem ter sido mais atrativos para *Ae. aegypti* do que outros. Um maior número de eventos de contaminação nos criadouros leva à acumulação de PPF e aumento da sua concentração, potenciando o seu efeito.

Os resultados sugerem que houve auto-disseminação de PPF no Paúl do mar. Os criadouros contaminados com PPF deverão levar à morte dos imaturos, o que, por conseguinte, resulta num menor número de adultos emergidos. O sucesso de uma medida de controlo é avaliado através da densidade da população de mosquitos local (Suman et al., 2014). A avaliação da abundância após a disseminação de PPF no Paúl do Mar revelou de que a intervenção não resultou em quaisquer alterações nas densidades de fêmeas *Ae. aegypti*, que são os adultos epidemiologicamente relevantes. Para compreender melhor estes resultados, consultaram-se os ovos recolhidos pelas armadilhas *ovitrap*s distribuídas no Paúl do Mar (gratuitamente disponibilizados pelo IASAUDE) (consultar a figura 19 abaixo), e verificou-se que ocorreu um abrupto decréscimo no número de ovos da semana 46 para a semana 47, que corresponde à última semana do 2º tratamento. A partir desta semana, o número de ovos por *ovitrap* manteve-se próximo de zero ou mesmo zero.

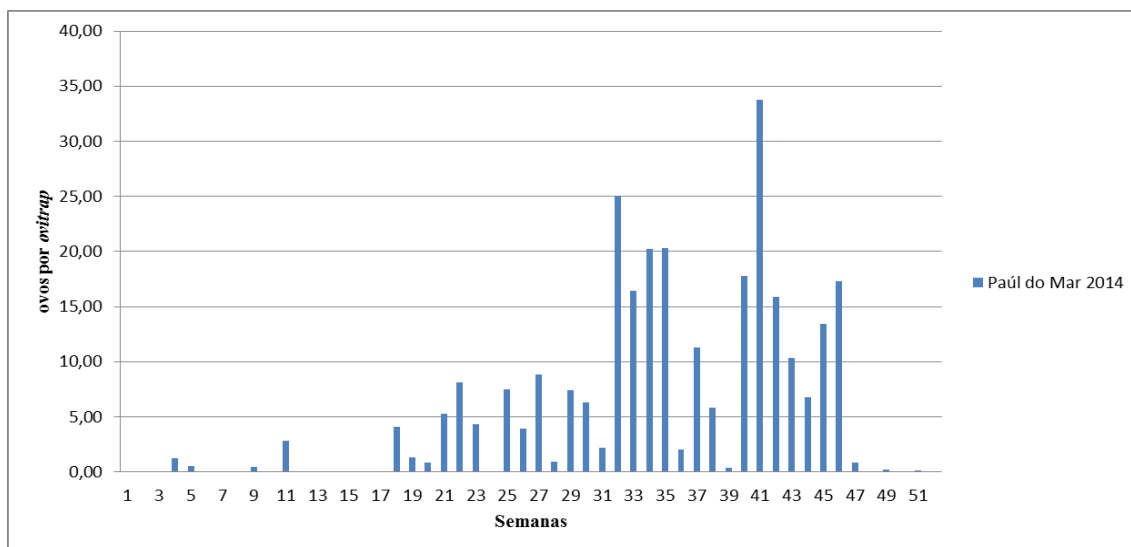


Figura 19: Número de ovos recolhidos por *ovitrap* por semana no Paúl do Mar em 2014

No sentido de compreender se este decréscimo é normal de acordo com a época sazonal ou não, foram, também, consultados os ovos recolhidos no decorrer do ano 2013, dados igualmente fornecidos pelo IASAUDE, ilustrados na figura 20 que se segue.

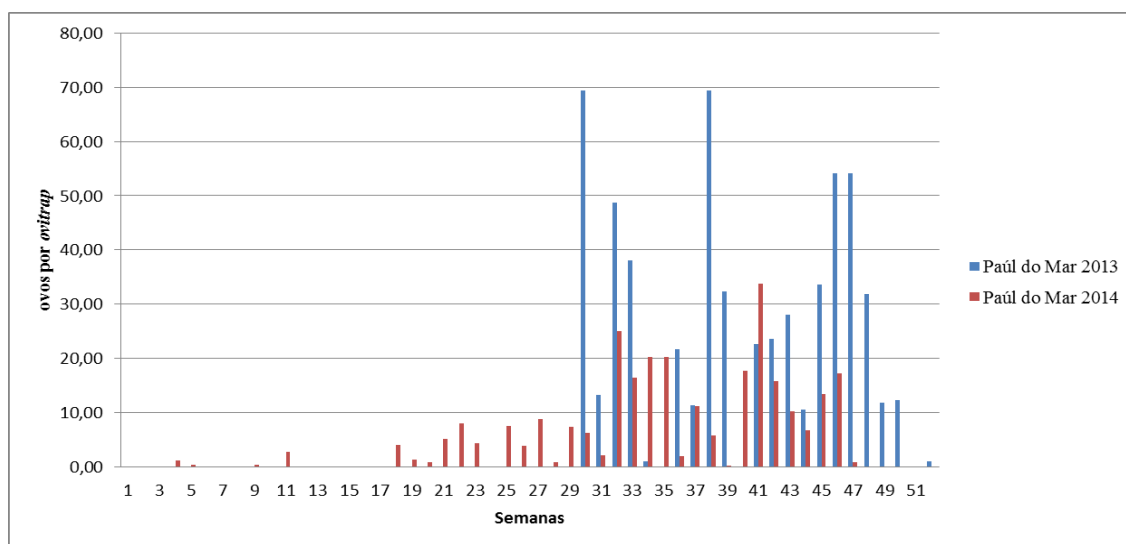


Figura 20: Número de ovos recolhidos por *ovitrap* por semana no Paúl do Mar nos em 2013 e 2014

Verificou-se que em 2013, no período entre as semanas 45 e 48 foi recolhido um elevado número de ovos por *ovitrap*. O mesmo não aconteceu no decorrer deste estudo, em que, após a disseminação de PPF, o número de ovos diminuiu cujo não voltou a aumentar. Dado que não se verificaram diferenças nas densidades de mosquitos entre o Paúl do Mar e o Funchal, foram consultados os ovos recolhidos no Funchal desde 2012, e entre o Funchal e o Paúl do Mar em 2014 (consultar as figuras 21 e 22 abaixo respectivamente) a fim de compreender se o decréscimo de ovos no Paúl do Mar poderá significar algum efeito da ação de PPF.

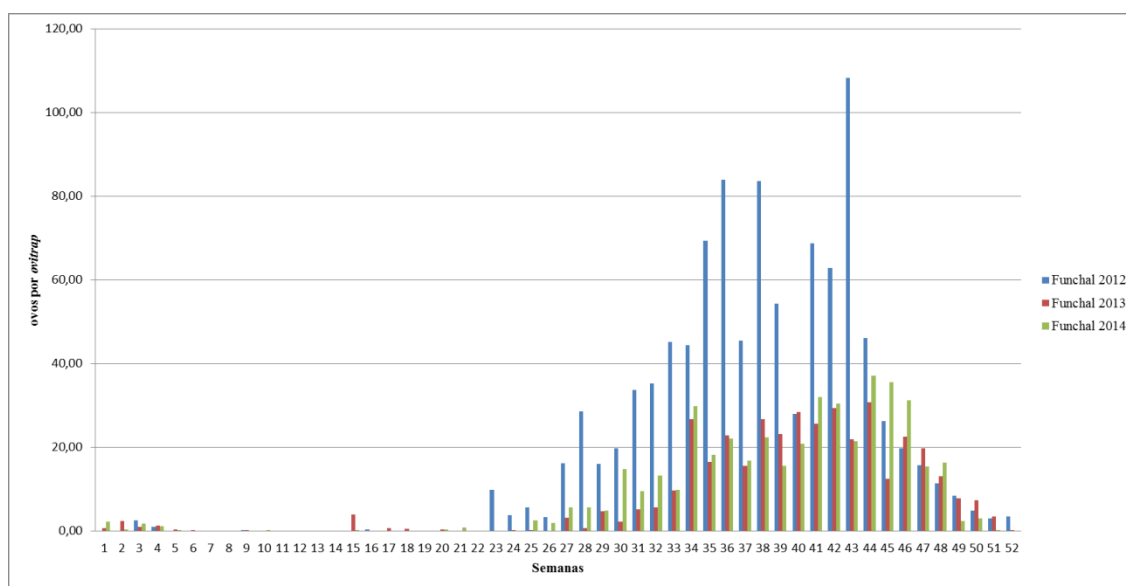


Figura 21: Número de ovos recolhidos por *ovitrap* por semana no Funchal em 2012, 2013 e 2014

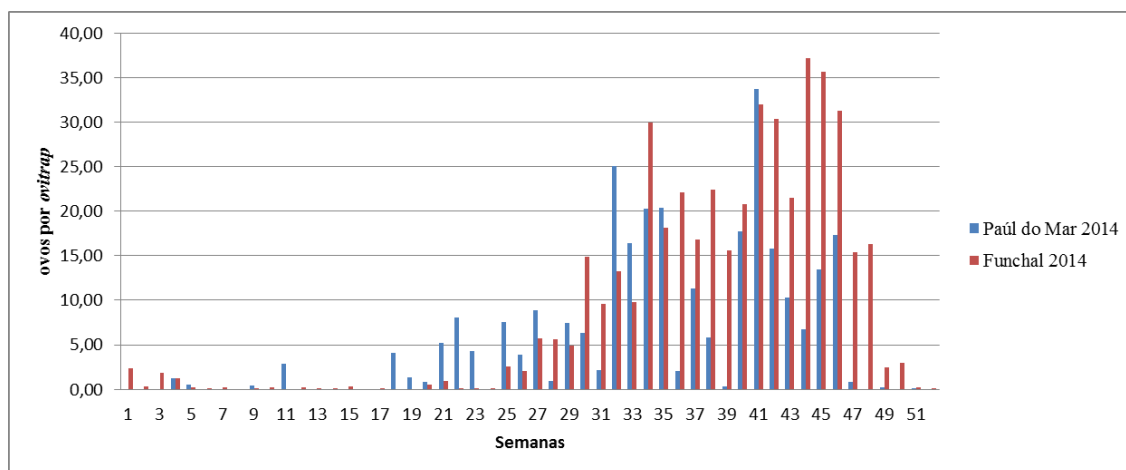


Figura 22: Número de ovos recolhidos por *ovitrap* no Paúl do Mar e no Funchal em 2014

Segundo os dados fornecidos pelas *ovitrap*s, o decréscimo do número de ovos observado no Paúl do Mar e no Funchal está de acordo com a variação da curva sazonal que se tem vindo a observar nos últimos anos. Todavia, no Funchal não ocorre a diminuição abrupta no número de ovos a partir da semana 46 como se verificou no Paúl do Mar. Estes dados sugerem a ação do efeito esterilizante de PPF, o que poderá justificar a diferença no número de ovos nas *ovitrap*s entre o Paúl do Mar e o Funchal, enquanto a densidade de mosquitos se manteve inalterada. Ensaio realizado por Itoh et al (1994) demonstraram que a exposição de fêmeas *Ae. aegypti* ao PPF antes ou até 24h após uma refeição de sangue, inibia a maturação dos ovos, e que o número de ovos postos por fêmeas diminuía quando estas eram expostas antes das refeições sanguíneas (Itoh et al., 1994). Ohbah et al (2013) realizaram um estudo em condições semi-laboratoriais, em que foram criados 2 microcosmos que simulavam jardins de habitações, para determinar o efeito de redes mosquiteiras contaminadas com PPF em *Ae. albopictus*. Os mosquitos libertados nos microcosmos tinham de passar por uma rede contaminada com PPF para poderem realizar uma refeição de sangue, logo eram expostas ao larvicida antes da refeição sanguínea. Estes autores observaram que o número de ovos postos pelas fêmeas libertadas nos microcosmos contendo as redes contaminadas foi inferior ao das fêmeas controlo. No entanto, não houve diferenças nas densidades de fêmeas entre o microcosmo teste 1 e controlo, e entre o microcosmo teste 2 e o controlo até 27 dias após libertação das fêmeas. Em suma, os resultados revelaram o efeito tardio da ação de PPF, que reduz significativamente o número de ovos, larvas, pupas e adultos de gerações seguintes, tanto pela inibição da produção de ovos como também por auto-disseminação do larvicida que causa a morte das formas imaturas (Ohba et al., 2013).

Concluindo, é possível que no Paúl do Mar a utilização de estações de disseminação de PPF direcionadas para fêmeas que procuram realizar uma refeição de sangue, e que também atraem machos, tenha resultado na esterilização dos mosquitos expostos a este larvicida. Inicialmente, os mosquitos podem ter emergido de criadouros que não estavam ainda contaminados com PPF, mantendo os níveis da densidade, no entanto, à medida que foram entrando em contato com PPF, quer nas estações de disseminação, quer em criadouros contaminados, é possível que o efeito esterilizante deste larvicida tenha interferido na fertilidade das fêmeas, e até mesmo na

espermioogénese dos machos, impedido que estas fossem capazes de maturar ou por ovos.

5.3. Bioensaio de transferência de piriproxifeno de machos adultos para fêmeas

A metodologia utilizada para disseminar PPF neste trabalho seguiu uma abordagem diferente daquela à qual se recorre convencionalmente. Utilizaram-se armadilhas BGs, que estão direcionadas para a captura de fêmeas que procuram realizar uma refeição de sangue, ao invés de armadilhas de oviposição, ou contentores que simulem criadouros de *Ae. aegypti*, que atraem fêmeas grávidas. Além disso, tem sido demonstrado que estas armadilhas capturam não só fêmeas como machos em quantidades semelhantes. Assim, no decorrer do estudo piloto de auto-disseminação no Paúl do Mar, é provável que tanto fêmeas como machos tenham sido expostos às partículas de PPF existentes nas armadilhas BGs.

Como já foi referido anteriormente neste trabalho, o impacto de PPF numa população de mosquitos pode ocorrer através da esterilização dos mosquitos que são expostos a este larvicida, e/ou por transferência das partículas para os seus próprios criadouros a partir de estações de disseminação. Desta forma, o bioensaio de transferência de PPF visou explorar se a exposição de machos a este químico nas estações de disseminação no Paúl do Mar poderá contribuir, também, para o controlo da população de *Ae. aegypti* local. Mains et al (2015) testaram a capacidade de machos *Ae. aegypti* contaminados com PPF em transferir este químico tanto para criadouros como para fêmeas não expostas, e se a exposição ao PPF causava alguma alteração na longevidade e sobrevivência nesses machos. Os resultados dos bioensaios demonstraram que os machos conseguem transferir com sucesso as partículas de PPF para fêmeas não expostas, e que essa contaminação horizontal terá ocorrido através do ato de cópula ou tentativas de cópula. Também verificaram que os machos contaminados são capazes de transferir as partículas de PPF para criadouros em doses suficientes para causar a mortalidade de formas imaturas e que a exposição direta ao PPF não demonstrou causar alterações na longevidade quando comparando com o grupo de machos controlo (Mains et al., 2015). Assim, teoricamente, é possível que os machos

após entrarem em contato com os sacos pulverizados com PPF nas armadilhas BGs no Paúl do Mar, sejam capazes de transferir este químico para fêmeas não expostas.

O bioensaio de transferência de PPF teve de ser interrompido por questões logísticas associadas ao prazo limitado da estadia na ilha da Madeira. Devido ao limite de tempo disponível, foi decidido que o período de oviposição decorreria durante 10 dias, após o qual as fêmeas foram capturadas e mortas pelo frio para posterior dissecção dos ovários. Quanto aos ovos postos durante esse período, apenas foi possível mergulhar os papéis de filtro contendo ovos correspondentes aos primeiros 5 dias de oviposição, a fim de se observar a percentagem de larvas eclodidas.

Os resultados demonstraram que as fêmeas expostas aos machos contaminados com PPF produziram um maior número de ovos, sendo que não só efetuaram a oviposição de um maior número de ovos como continham um maior número de ovos retidos. No entanto, não se observaram diferenças estatisticamente significativas entre o número total de ovos produzidos (ovos postos e ovos retidos) entre o grupo de fêmeas controlo e os grupos de fêmeas teste. A única exceção foi o grupo de fêmeas teste 2, cuja produção de ovos foi inferior à do grupo de fêmeas controlo, além de que continham um menor número de ovos retidos. Quanto às eclosões, apenas se verificaram diferenças significativas entre os grupos de fêmeas teste 3 e 4, cujo número de eclosões foi inferior às do grupo de fêmeas controlo.

A possibilidade das fêmeas realizarem refeições de sangue ocorreu 24h e 72h após a exposição aos machos contaminados com PPF. Verificou-se que na primeira possibilidade de realizarem refeição de sangue, nem todas as fêmeas se alimentaram, tendo apenas recorrido à refeição de sangue após 72h de contato com os machos. Segundo os bioensaios realizados por Itoh et al (1994), quando fêmeas *Ae. aegypti* foram expostas a uma superfície contaminada com PPF 4 dias antes de realizarem refeição de sangue, ou no próprio dia, o efeito na redução do número de ovos postos era significativamente superior ao observado quando a exposição ocorria após a alimentação. Ohba et al (2013), com *Ae. albopictus*, verificaram que fêmeas expostas no próprio dia em que lhes era fornecida a oportunidade de realizarem uma refeição de sangue, efetuavam posturas significativamente menores que as fêmeas controlo além de que a eclosão dos mesmos era significativamente inferior.

Outros estudos realizados no sentido de analisar o efeito esterilizante da exposição de mosquitos pertencentes a outros géneros e espécies, revelaram resultados diferentes. Harris et al (2013) verificaram que a exposição de fêmeas *Anopheles arabiensis* (Patton, 1905), vetor de malária, ao PPF 72h e 24h antes da refeição de sangue, e 24h e 72h após a refeição de sangue não resultava em quaisquer diferenças na produção total de ovos entre os grupos teste e controlo. Quanto ao número de ovos postos e retidos, estes apenas observaram a redução na taxa de eclosão e aumento no número de ovos retidos no grupo teste exposto 24h após a refeição de sangue. Os grupos de fêmeas que foram expostos ao PPF antes das refeições de sangue não demonstraram quaisquer alterações na fecundidade e fertilidade em comparação com os grupos controlo (Harris et al., 2013). Noutro estudo realizado por Mbare et al (2014) com *Anopheles gambiae sensu stricto* (Giles, 1902), vetor de malária, e *Culex quinquefasciatus* (Say, 1823), vetor de arbovírus e filariose linfática, demonstrou que a exposição das fêmeas ao PPF num intervalo entre 24h antes ou 24h após a refeição de sangue resultava na esterilização das mesmas. O efeito da exposição ao PPF nesse intervalo, em *An. gambiae* s.s., reduziu o número de fêmeas que puseram ovos, o número de ovos postos e de eclosões, enquanto que, em *Cx. quinquefasciatus* esse efeito incidiu particularmente na redução do número de fêmeas que efetuaram posturas. No geral, a exposição das fêmeas ao PPF levou à redução de 91-94%, em *An. gambiae* s.s., e 60-75%, em *Cx. quinquefasciatus*, na prole gerada em comparação com os grupos controlo (Mbare et al., 2014). No entanto, há que referir que todos estes estudos analisam o efeito da aplicação direta de PPF em que fêmeas fecundadas, e não avaliam o sucesso do PPF na fertilidade e fecundidade de fêmeas cuja exposição a este análogo da HJ se efetua através da cópula com machos contaminados com este químico.

Quanto aos resultados obtidos no bioensaio de transferência de PPF, estes podem ser considerados preliminares, dado que o bioensaio não pôde ser levado até ao fim e nem todos os dados foram recolhidos na sua totalidade, como no caso das eclosões. Quando comparando com os estudos acima referenciados, parece haver evidência de que a exposição de fêmeas ao PPF antes das refeições de sangue leva à redução da fertilidade e fecundidade. Embora o número de ovos produzidos, postos, e retidos pelas fêmeas expostas neste bioensaio tenha sido, na sua maioria, superior ao das fêmeas controlo, verificou-se uma diminuição na taxa de eclosão em dois dos quatro

grupos de fêmeas teste. Ainda que essas fêmeas tenham posto mais ovos que o grupo controle, houve diferenças significativas nas taxas de eclosão, o que indica que nem todos os ovos postos eram viáveis. Desta forma, apesar das fêmeas terem posto mais ovos, a exposição ao PPF aparenta interferir na maturação dos ovos, levando à produção de ovos inviáveis.

Em suma, são necessários mais estudos por forma a explorar os efeitos que a exposição de PPF tem na fecundidade e fertilidade de *Ae. aegypti*. Seria interessante repetir este bioensaio com um maior número de réplicas e mais do que uma ronda, para recolha de um maior e completo número de dados e resultados. Além disso, não havendo limite de tempo, poder-se-ia acompanhar a oviposição até que as fêmeas deixassem de por ovos, em vez de se interromper o processo, e acompanhar o desenvolvimento das formas imaturas, que advêm da prole gerada após a exposição das fêmeas ao PPF, até à emergência dos adultos. Por último, os ensaios realizados por outros autores consultados na pesquisa bibliográfica recorrem a superfícies contaminadas com PPF para expor as fêmeas, ao invés da transferência entre exemplares da mesma espécie, sendo que se poderia elaborar um bioensaio em que ambas as vertentes fossem testadas por forma a comparar resultados, e averiguar se o tipo de exposição causa efeitos diferentes na fertilidade e fecundidade.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O mosquito *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) realiza a oviposição por vários criadouros no mesmo ciclo gonotrófico, distribuindo os seus ovos por forma a garantir a sobrevivência da espécie. Visto que é um mosquito essencialmente urbano e antropofílico, os seus criadouros são pequenos compartimentos de origem peridoméstica que podem ir desde embalagens, pratos florais, pneus, entre outros. Estas características dificultam o sucesso de medidas de controlo vetoriais direcionadas para as fases imaturas, devido à dificuldade na deteção e eliminação de todos os criadouros passíveis de serem biótopos larvares de *Ae. aegypti*. A utilização de um análogo da HJ, como PPF, é uma medida promissora para o controlo vetorial desta espécie pelas suas características comportamentais de oviposição (Devine et al., 2009).

Desde a ocorrência do surto na Ilha da Madeira, em 2012, não têm sido detetados mais casos autóctones na região, apesar do mosquito continuar a apresentar elevados níveis de densidade, particularmente na cidade do Funchal. A persistência do mosquito na Madeira constitui um risco constante para o surgimento de novos surtos de dengue, provocados pelo serotipo DENV-1, além da possível introdução de outros serotipos de dengue, e de epidemias por outros arbovírus transmitidos por este vetor, como o vírus da febre-amarela e o vírus chickungunya, devido ao elevado movimento de pessoas e bens entre a ilha e países onde estes arbovírus são endémicos, como o Brasil (Villabona-Arenas et al., 2014), Venezuela (Urdaneta et al., 2005) e Angola (Parreira et al., 2014). A utilização deste larvicida associado a outras medidas de controlo vetorial já utilizadas na Ilha da Madeira poderá contribuir para a diminuição das densidades populacionais de *Ae. aegypti* nas áreas urbanas. Assim, por forma a reduzir o risco de transmissão de dengue e de outras doenças que são transmitidas por este vetor, é essencial que a população de *Ae. aegypti* seja mantida em níveis de densidade reduzidos.

Piriproxifeno é classificado pela OMS como um composto de classe “U”, que é considerado moderadamente tóxico para peixes, e altamente tóxico para zooplâncton (IPCS & IOMC, 2010), além de poder interferir com outras populações de insetos. Assim, é importante salientar que a abordagem de auto-disseminação recorre a estações de disseminação que simulam criadouros de *Ae. aegypti*, como as armadilhas *ovitrap*s, ou que atraem mosquitos que procuram realizar uma refeição de sangue, como as

armadilhas BGs utilizadas neste estudo. Dado que os criadouros de *Ae. aegypti* são pequenos compartimentos de origem peri-doméstica localizados nas áreas urbanas, e as armadilhas estão direcionadas para atrair mosquitos, a utilização de PPF é facilmente controlável não devendo causar grande impacto na fauna aquática, noutras populações de insetos, e no ambiente em geral.

Os resultados obtidos neste trabalho são promissores e podem ser considerados como um ponto de partida para a implementação de uma nova estratégia de controlo na Ilha da Madeira. Se esta abordagem fosse aplicada numa área mais extensa, com maior abundância de mosquitos, como, por exemplo, na cidade do Funchal, e associada às medidas já atualmente aplicadas, é possível que se consiga controlar e baixar efetivamente a população de *Ae. aegypti* na Ilha da Madeira.

7. BIBLIOGRAFIA

- Agência Estatal de Meteorologia de Espanha & Instituto de Meteorologia de Portugal 2011, 2012. *Atlas Climático dos Arquipélagos das Canárias, da Madeira e dos Açores* I. de M. de Portugal & A. E. de M. Ministerio de Agricultura Alimentación y Medio Ambiente, eds., Lisboa.
- Almeida, A., Gonçalves, Y., Novo, M., Sousa, C., Melim, M., & Grácio, A. (2007). Vector monitoring of *Aedes aegypti* in the Autonomous Region of Madeira, Portugal. *Eurosurveillance*, 12(46), 3311. Retrieved from <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=3311>
- Almeida, P. G. de. (2011). Os mosquitos (Diptera, Culicidae) e a sua importância médica em Portugal Desafios para o Século XXI. *Acta Médica Portuguesa*, 24(6), 961–974.
- Alves, G. (2014). *Ferramentas para o controlo de formas larvares de Aedes (Stegomyia) aegypti (Diptera: Culicidae) na cidade do Funchal*. Tese de Mestrado, IHMT, Universidade Nova de Lisboa.
- Alves, M. J., Fernandes, P. L., Amaro, F., Osório, H., Luz, T., Parreira, P., ... Zeller, H. (2013). Clinical presentation and laboratory findings for the first autochthonous cases of dengue fever in Madeira island , Portugal , October 2012. *Eurosurveillance*, 18(6), 3–6.
- Andrew, J., & Bar, A. (2013). Morphology and Morphometry of *Aedes aegypti* Adult Mosquito. *Annual Review & Research in Biology*, 3(1), 52–69.
- Araújo, R. N., Gontijo, N. de F., Lazzari, C. R., & Pereira, M. H. (2012). Interação entre os Insetos Hematófagos e seus Hospedeiros Vertebrados . *Tópicos Avançados Em Entomologia Molecular*, 1–19.
- Attardo, G. M., Hansen, I. A., & Raikhel, A. S. (2005). Nutritional regulation of vitellogenesis in mosquitoes: implications for anautogeny. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 35(7), 661–75. doi:10.1016/j.ibmb.2005.02.013

- Barrett, A. D. T., & Higgs, S. (2007). Yellow fever: a disease that has yet to be conquered. *Annual Review of Entomology*, 52, 209–29. doi:10.1146/annurev.ento.52.110405.091454
- Bergero, P. E., Ruggerio, C. A., Lombardo, R., Schweigmann, N. J., & Solari, H. G. (2013). Dispersal of *Aedes aegypti*: Field study in temperate areas using a novel method. *Journal of Vector Borne Diseases*, 50, 163–170.
- Biogents. (n.d.-a). BG-Sentinel: The researchers' mosquito trap. Retrieved May 12, 2015, from http://www.biogents.com/cms/website.php?id=/en/traps/mosquito_traps/bg_sentinel.htm
- Biogents. (n.d.-b). New: BG-GAT (Gravid Aedes Trap) for researchers. Retrieved May 13, 2015, from http://www.biogents.com/cms/website.php?id=/en/traps/biogents-trap-systems/bg_gat.htm&scroll=scrollpage_text6895#News_BG_GAT
- Borges, P. A. V., Abreu, C., Aguiar, A. F., Carvalho, P., Fontinha, S., Jardim, R., ... Vieira, P. (2008). *Terrestrial and freshwater biodiversity of the Madeira and Selvagens archipelagos*. *Repositório da Universidade dos Açores* (pp. 13–25). Funchal & Angra do Heroísmo: Direcção Regional do Ambiente da Madeira / Universidade dos Açores. Retrieved from <http://hdl.handle.net/10400.3/1955>
- Braga, I. A., & Valle, D. (2007). *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. *Epidemiologia E Serviços de Saúde*, 16(4), 279–293. doi:10.5123/S1679-49742007000400006
- Bryant, J. E., Holmes, E. C., & Barrett, A. D. T. (2007). Out of Africa: a molecular perspective on the introduction of yellow fever virus into the Americas. *PLoS Pathogens*, 3(5), 0668–0673. doi:10.1371/journal.ppat.0030075
- Calheta, C. M. da. (2015). Concelho da Calheta, História. Retrieved March 05, 2015, from <http://www.cmcalheta.pt/wordpress/?cat=3>

- Caputo, B., Ienco, A., Cianci, D., Pombi, M., Petrarca, V., Baseggio, A., ... della Torre, A. (2012). The “auto-dissemination” approach: a novel concept to fight *Aedes albopictus* in urban areas. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(8), 1–8. doi:10.1371/journal.pntd.0001793
- Cavrini, F., Gaibani, P., Pierro, A. M., Rossini, G., & Landini, M. P. (2009). Chikungunya : an emerging and spreading arthropod-borne viral disease. *Journal of Infection in Developing Countries*, 10(3), 744–752.
- Chadee, D. D., Lakhan, A., Ramdath, W. R., & Persad, R. (1993). Oviposition response of *Aedes aegypti* mosquitoes to different concentrations of hay infusion in Trinidad, West Indies. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 9(3), 346–348.
- Christophers, S. R. (1960). *Aedes aegypti* (L.) the yellow fever mosquito: its life history, bionomics and structure (p. 750). London: UK: Cambridge University Press.
- Costa, L. G., Giordano, G., Guizzetti, M., & Vitalone, A. (2008). Neurotoxicity of pesticides: a brief review. *Frontiers in Bioscience*, 13, 1240–1249.
- Crinnion, W. J. (2000). Biologically Persistent and Ubiquitous Toxins . *Alternative Medicine Review*, 5(5), 432–447.
- David, M. R., Lourenço-de-oliveira, R., & Freitas, R. M. De. (2009). Container productivity , daily survival rates and dispersal of *Aedes aegypti* mosquitoes in a high income dengue epidemic neighbourhood of Rio de Janeiro : presumed influence of differential urban structure on mosquito biology. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 104(6), 927–932.
- Devine, G. J., & Killeen, G. F. (2010). The potential of a new larviciding method for the control of malaria vectors. *Malaria Journal*, 9, 142. doi:10.1186/1475-2875-9-142
- Devine, G. J., Zamora, E., Killeen, G. F., Stancil, J. D., Clark, S. J., & Morrison, A. C. (2009). Using adult mosquitoes to transfer insecticides to *Aedes aegypti* larval habitats. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(28), 1–5.

- Dhadialla, T. S., Carlson, G. R., & Le, D. P. (1998). New insecticides with ecdysteroidal and juvenile hormone activity. *Annual Review of Biochemistry*, 43, 545–569.
- DREM. (2011). Área e população residente por freguesia, 2011. Retrieved March 05, 2015, from <http://estatistica.gov-madeira.pt/index.php/download-now/ambiente-territorio/territorio-pt/territorio-quadros-pt>
- ECDC. (2013). *Dengue outbreak in Madeira , Portugal, October-November 2012*. Stockholm.
- ECDC. (2014). *Dengue outbreak in Madeira , Portugal, March 2013*. Stockholm.
- Eiras, A. E., Buhagiar, T. S., & Ritchie, S. A. (2014). Development of the Gravid Aedes Trap for the Capture of Adult Female Container – Exploiting Mosquitoes (Diptera : Culicidae). *Vector-Borne Diseases, Surveillance, Prevention*, 51(1), 200–209.
- Espanha, A. E. de M. de, & Portugal, I. de M. de. (2012). *Atlas Climático dos Arquipélagos das Canárias, da Madeira e dos Açores*. (I. de M. de Portugal & A. E. de M. Ministerio de Agricultura Alimentación y Medio Ambiente, Eds.) *Agência Estatal de Meteorologia de Espanha & Instituto de Meteorologia de Portugal* (p. 80). Lisboa.
- Failloux, A.-B., Vazeille, M., & Rodhain, F. (2002). Geographic genetic variation in populations of the dengue virus vector *Aedes aegypti*. *Journal of Molecular Evolution*, 55(6), 653–663. doi:10.1007/s00239-002-2360-y
- Funchal, C. M. do. (n.d.). Plano Municipal de Combate ao Mosquito Vetor de Transmissão da Dengue. Retrieved May 23, 2015, from http://www.cm-funchal.pt/todoscontraamosquito/index.php?option=com_content&view=frontpage&Itemid=1
- George, S. R. (1957). Laboratory tests on mosquito tolerance to insecticides and the development of Resistance by *Aedes aegypti*. *Bulletin of the World Health Organization*, 17, 377–411.

- Georghiou, G. P. (1994). Principles of insecticide resistance management. *Phytoprotection*, 75(4), 51–59.
- Gonçalves, Y., Silva, J., & Biscoito, M. (2008). On the presence of *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* Linnaeus , 1762 (Isecta, Diptera, Culicidae) in the island of Madeira (Portugal), 58(322), 53–59.
- Gubler, D. J. (2011). Dengue, Urbanization and Globalization: The Unholy Trinity of the 21(st) Century. *Tropical Medicine and Health*, 39(4), 3–11. doi:10.2149/tmh.2011-S05
- Halstead, S. B. (2008). *Dengue Tropical Medicine: Science and Practice*. (P. Geoffrey & H. S. L., Eds.) (5th ed., p. 506). London: UK: Imperial College Press.
- Harris, C., Lwetoijera, D. W., Dongus, S., Matowo, N. S., Lorenz, L. M., Devine, G. J., & Majambere, S. (2013). Sterilising effects of pyriproxyfen on *Anopheles arabiensis* and its potential use in malaria control. *Parasites & Vectors*, 6(1), 144. doi:10.1186/1756-3305-6-144
- Hedenqvist, P., & Hellebrekers, L. J. (2003). Laboratorial Animal Analgesia, Anesthesia, and Euthanasia. In J. Hau & Gerald L. Van Hoosier (Eds.), *Handbook of Laboratory Animal Science* (Second., p. 548). Washington, D.C.: CRC Press.
- Holstein, M. (1967). Dynamics of *Aedes aegypti* Distribution , Density and Seasonal Prevalence in the Mediterranean Area, 36, 541–543.
- IASAÚDE. (2012). Atividades efetuadas por técnicos do IASAÚDE, IP-RAM. Retrieved May 23, 2015, from <http://iasaude.sras.gov-madeira.pt/mosquitos/>
- INE. (2012). *Censos 2011 Resultados Definitivos - Região Autónoma da Madeira*. Lisboa.
- Invest, J. F., & Lucas, J. R. (2008). Pyriproxyfen as a mosquito larvicide. In *Proceedings of the Sixth International Conference on Urban Pests* (pp. 239–246).

- IPCS, & IOMC. (2010). *The WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard and Guidelines to Classification: 2009* (pp. 1–78). Geneva, Switzerland.
- Itoh, T., Kawada, H., Abe, A., Eshita, Y., Rongsriyam, Y., & Igarashi, A. (1994). Utilization of bloodfed females of *Aedes aegypti* as a vehicle for the transfer of the insect growth regulator pyriproxyfen to larval habitats. *Journal O F the American Mosquito Control Association*, 10(3), 344–347.
- Jansen, C. C., & Beebe, N. W. (2010). The dengue vector *Aedes aegypti*: what comes next. *Microbes and Infection*, 12(4), 272–279. doi:10.1016/j.micinf.2009.12.011
- Krockel, U., Rose, A., Eiras, L. E., & Martin, G. (2006). New tools for surveillance of adult yellow fever mosquitoes: comparison of trap catches with human landing rates in an urban environment. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 22(2), 229–238.
- Kuno, G. (2010). Early history of laboratory breeding of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) focusing on the origins and use of selected strains. *Journal of Medical Entomology*, 47(6), 957–971.
- Liu, N. (2015). Insecticide Resistance in Mosquitoes: Impact, Mechanisms, and Research Directions. *Annual Review of Entomology*, 60(1), 537–559. doi:10.1146/annurev-ento-010814-020828
- Maciel-de-freitas, R., Eiras, Á. E., & Lourenço-de-oliveira, R. (2006). Field evaluation of effectiveness of the BG-Sentinel, a new trap for capturing adult *Aedes aegypti* (Diptera : Culicidae). *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 101(3), 321–325.
- Maciel-de-freitas, R., & Lourenço-de-oliveira, R. (2009). Presumed unconstrained dispersal of *Aedes aegypti* in the city of Rio de Janeiro , Brazil. *Revista de Saúde Pública*, 43(1), 8–12.
- Mains, J. W., Brelsfoard, C. L., & Dobson, S. L. (2015). Male mosquitoes as vehicles for insecticide. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9(1), e0003406. doi:10.1371/journal.pntd.0003406

- Manjarres-Suarez, A., & Olivero-Verbel, J. (2013). Chemical control of *Aedes aegypti*: a historical perspective. *Revista Costarricense de Salud Pública*, 22(1), 68–75.
- Marquardt, W., Black, C. W., Freirer, E. J., Hagedorn, H., Moore, C., Hemingway, J., ... Kondratieff, B. (2005). *Biology of Disease Vectors*. (W. C. Marquardt, Ed.) (2nd ed., Vol. 40, p. 9823). London: UK: Elsevier Academic Press. doi:10.1002/1521-3773(20010316)40:6<9823::AID-ANIE9823>3.3.CO;2-C
- Mbare, O., Lindsay, S. W., & Fillinger, U. (2014). Pyriproxyfen for mosquito control: female sterilization or horizontal transfer to oviposition substrates by *Anopheles gambiae* sensu stricto and *Culex quinquefasciatus*. *Parasites & Vectors*, 7(1), 280. doi:10.1186/1756-3305-7-280
- Melim, M. (2009). *Aedes aegypti* em Portugal: a presença de *Aedes aegypti* na Região Autónoma da Madeira. In *Comunicação oral, Reunião do Projeto Revive*.
- Melim, M. (2012). Da presença do *Aedes aegypti* ao aparecimento do dengue na Região Autónoma da Madeira. Retrieved April 06, 2015, from [http://iasaude.sras.gov-madeira.pt/mosquitos/Uploads/Anexos/Aedes e dengue MM\[1\].pdf](http://iasaude.sras.gov-madeira.pt/mosquitos/Uploads/Anexos/Aedes e dengue MM[1].pdf)
- Natal, D. (2002). Bioecologia do *Aedes aegypti*. *Biológico*, 64(2), 205–207.
- Ohba, S., Ohashi, K., Pujiyati, E., Higa, Y., Kawada, H., Mito, N., & Takagi, M. (2013). The effect of pyriproxyfen as a “population growth regulator” against *Aedes albopictus* under semi-field conditions. *PloS One*, 8(7), e67045. doi:10.1371/journal.pone.0067045
- Parreira, R., Centeno-Lima, S., Lopes, A., Portugal-Calisto, D., Constantino, A., & Nina, J. (2014). Dengue virus serotype 4 and chikungunya virus coinfection in a traveller returning from Luanda, Angola, January 2014. *Eurosurveillance*, 19(10), 1–4. doi:10.2807/1560-7917.ES2014.19.10.20730
- Poletto, D. W., Rodas, L. A. C., Koyanagui, P. H., Botti, M. V, Mucci, L. F., & Gomes, A. D. C. (2005). Entomological investigation of a sylvatic yellow fever area in São Paulo State , Brazil Investigação entomológica em área de ocorrência de febre

- amarela silvestre no Estado de São Paulo , Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*, 21(4), 1278–1286.
- Polson, K. A., Curtis, C., Seng, C. M., & Olson, J. G. (2002). The Use of Ovitraps Baited with Hay Infusion as a Surveillance Tool for *Aedes aegypti* Mosquitoes in Cambodia. *Dengue Bulletin*, 26, 178–184.
- Ponnusamy, L., Xu, N., Böröczky, K., Wesson, D. M., Abu Ayyash, L., Schal, C., & Apperson, C. S. (2010). Oviposition responses of the mosquitoes *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* to experimental plant infusions in laboratory bioassays. *Journal of Chemical Ecology*, 36(7), 709–19. doi:10.1007/s10886-010-9806-2
- Powell, J. R., & Tabachnick, W. J. (2013). History of domestication and spread of *Aedes aegypti*--a review. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 108, 11–7. doi:10.1590/0074-0276130395
- Ranson, H., Burhani, J., Lumjuan, N., & IV, W. C. B. (2010). Insecticide resistance in dengue vectors, 1–12. Retrieved from <http://journal.tropika.net/pdf/tropika/v1n1/a03v1n1.pdf>
- Reiter, P., Amador, M. A., & Nelson, A. U. I. (1991). Enhancement of the CDC ovitrap with hay infusions for daily monitoring of *Aedes aegypti* populations. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 7(1), 52–55.
- Riddiford, L. M. (2012). How does juvenile hormone control insect metamorphosis and reproduction? *General and Comparative Endocrinology*, 179(3), 477–84. doi:10.1016/j.ygcen.2012.06.001
- Ritchie, S. A., Buhagiar, T. S., Townsend, M., Hoffmann, A., Hurk, A. F. Vanden, McMahon, J. L., & Eiras, A. E. (2014). Field Validation of the Gravid *Aedes* Trap (GAT) for Collection of *Aedes aegypti* (Diptera : Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, 51(1), 210–219.
- Rodrigues, H. S., Monteiro, M. T. T., Torres, D. F. M., Silva, A. C., Sousa, C., & Conceição, C. (2014). Dengue in Madeira Island. In *CIM Series in Mathematical*

- Sciences. Populations and Evolution; Optimization and Control*. Retrieved from <http://arxiv.org/abs/1409.7915>
- Seixas, G. (2012). *Aedes (Stegomyia) aegypti (Diptera, Culicidae) da ilha da Madeira: origem geográfica e resistência aos insecticidas*. Tese de Mestrado, IHMT, Universidade Nova de Lisboa.
- Seixas, G., Salgueiro, P., Silva, A. C., Campos, M., Spenassatto, C., Reyes-Lugo, M., ... Sousa, C. A. (2013). *Aedes aegypti* on Madeira Island (Portugal): genetic variation of a recently introduced dengue vector. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 108(1), 3–10. doi:10.1590/0074-0276130386
- Silvano, J., & Abreu, C. (2014). Dengue nos Países da Lusofonia : Que Ligações Epidemiológicas Poderemos Traçar? *Acta Médica Portuguesa*, 27(4), 503–510.
- Sláma, K. (1971). Insect juvenile hormone analogues. *Annual Review of Biochemistry*, 40, 1079–102. doi:10.1146/annurev.bi.40.070171.005243
- Sousa, C. A., Clairouin, M., Seixas, G., Viveiros, B., Novo, M. T., Silva, A. C., ... Economopoulou, A. (2012). Ongoing outbreak of dengue type 1 in the Autonomous Region of Madeira , Portugal : preliminary report. *Eurosurveillance*, 17(49), 8–11.
- Spiegel, J., Bennett, S., Hattersley, L., Hayden, M. H., Kittayapong, P., Nalim, S., ... Gubler, D. (2005). Barriers and Bridges to Prevention and Control of Dengue: The Need for a Social–Ecological Approach. *EcoHealth*, 2(4), 273–290. doi:10.1007/s10393-005-8388-x
- Staal, G. B. (1975). Insect Growth Regulators with Juvenile Hormone Activity. *Annual Review of Entomology*, 20, 417–460.
- Staples, J. E., Breiman, R. F., & Powers, A. M. (2009). Chikungunya fever: an epidemiological review of a re-emerging infectious disease. *Clinical Infectious Diseases*, 49(6), 942–8. doi:10.1086/605496

- Suman, D. S., Farajollahi, A., Healy, S., Williams, G. M., Wang, Y., Schoeler, G., & Gaugler, R. (2014). Point-source and area-wide field studies of pyriproxyfen autodissemination against urban container-inhabiting mosquitoes. *Acta Tropica*, 135, 96–103. doi:10.1016/j.actatropica.2014.03.026
- Thiberville, S.-D., Moyen, N., Dupuis-Maguiraga, L., Nougairede, A., Gould, E. a, Roques, P., & de Lamballerie, X. (2013). Chikungunya fever: epidemiology, clinical syndrome, pathogenesis and therapy. *Antiviral Research*, 99(3), 345–70. doi:10.1016/j.antiviral.2013.06.009
- Thiboutot, M. M., Kannan, S., Kawalekar, O. U., Shedlock, D. J., Khan, A. S., Sarangan, G., ... Muthumani, K. (2010). Chikungunya: a potentially emerging epidemic? *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 4(4), e623. doi:10.1371/journal.pntd.0000623
- Tunaz, H., & Uygun, N. (2004). Insect Growth Regulators for Insect Pest Control. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 28, 377–387.
- Unlu, I., & Farajollahi, A. (2012). Vectors Without Borders : Imminent Arrival, Establishment, and Public Health Implications of The Asian Bush (Aedes Japonicus) and Asian Tiger (Aedes Albopictus) Mosquitoes in Turkey. *The Journal of Biological Chemistry*, 40(1), 23–36.
- Urdaneta, L., Herrera, F., Pernalete, M., Zoghbi, N., Rubio-Palis, Y., Barrios, R., ... Salcedo, M. (2005). Detection of dengue viruses in field-caught Aedes aegypti (Diptera: Culicidae) in Maracay, Aragua state, Venezuela by type-specific polymerase chain reaction. *Infection, Genetics and Evolution : Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, 5(2), 177–84. doi:10.1016/j.meegid.2004.09.004
- Van den Berg, H., Zaim, M., Yadav, R. S., Soares, A., Ameneshewa, B., Mnzava, A., ... Ejov, M. (2012). Global trends in the use of insecticides to control vector-borne diseases. *Environmental Health Perspectives*, 120(4), 577–82. doi:10.1289/ehp.1104340

- Vasconcelos, P. F. da C. (2003). Febre amarela Yellow fever. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 36(2), 275–293.
- Villabona-Arenas, C. J., de Oliveira, J. L., Capra, C. D. S., Balarini, K., Loureiro, M., Fonseca, C. R. T. P., ... Zanotto, P. M. D. A. (2014). Detection of four dengue serotypes suggests rise in hyperendemicity in urban centers of Brazil. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8(2), 1–3. doi:10.1371/journal.pntd.0002620
- Wermelinger, E. D., & Ferreira, A. P. (2013). Métodos de controle de insetos vetores: um estudo das classificações. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*, 4(3), 49–54. doi:10.5123/S2176-62232013000300007
- WHO. (2004). *Global Strategic Framework for Integrated Vector Management*. Geneve, Switzerland.
- WHO. (2011a). *Guidelines for Drinking-water Quality* (Fourth., p. 541). Geneve, Switzerland.
- WHO. (2011b). *Guidelines for monitoring the durability of long-lasting insecticidal mosquito nets under operational conditions*. Geneve, Switzerland.
- WHO. (2011c). *The use of DDT in malaria vector control WHO position statement*. Geneve, Switzerland.
- WHO. (2012). *Global strategy for dengue prevention and control 2012-2020*. Geneve, Switzerland.
- WHO. (2013). *Test procedures for insecticide resistance monitoring in malaria vector mosquitoes* (p. 40). Geneve, Switzerland.
- WHO, & TDR. (2009). *Dengue Guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control*. Geneve, Switzerland.
- WHOPES. (2006). *Pesticides and their application - For the control of vectors and pest of public health importance* (6^a ed.). Geneve, Switzerland.

- WHOPES. (2013). Recommended compounds and formulations for control of mosquito larvae. Retrieved May 23, 2015, from http://www.who.int/whopes/Mosquito_Larvicides_25_Oct_2013.pdf?ua=1
- Williams, C. R., Long, S. A., Russell, R. C., & Scott, A. (2006). Field efficacy of the BG-Sentinel compared with CDC Backpack Aspirators and CO₂-baited EVS traps for collection of adult *Aedes aegypti* in Cairns, Queensland, Australia. *Journal of American Mosquito Control Association*, 22(2), 296–300.
- Williams, C. R., Long, S. a., Webb, C. E., Bitzhenner, M., Geier, M., Russell, R. C., & Ritchie, S. a. (2007). *Aedes aegypti* Population Sampling Using BG-Sentinel Traps in North Queensland Australia: Statistical Considerations for Trap Deployment and Sampling Strategy. *Journal of Medical Entomology*, 44(2), 345–350. doi:10.1603/0022-2585(2007)44[345:AAPSUB]2.0.CO;2